UNIVERSITE DE PARIS

FACULTE DE PHARMACIE

Année scolaire 1946-1947 Série Etat N° 19

LE PREGNANDIOL

ETUDE CHIMIQUE ET PHYSIOLOGIQUE

THESE

soutenue pour l'obtention du grade de
Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'Etat)

Présentée et soutenue le 13 - 3 1947

par

JEAN DREANO
Pharmacien
Licencié es Sciences
Ancien Interne des Hôpitaux de Paris

JURY : MM. P. FLEURY, *Président.*
R. FABRE, *Doyen.*
G. VALETTE, *Professeur.*

IMPRIMERIE DE LA LYS
VENDIN-LE-VIEIL - (P.-de-C.)

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTE DE PHARMACIE

Année scolaire 1946-1947 Série Etat N° 19

LE PREGNANDIOL

ETUDE CHIMIQUE ET PHYSIOLOGIQUE

THESE

soutenue pour l'obtention du grade de
Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'Etat)

Présentée et soutenue le 1947

par

JEAN DREANO
Pharmacien
Licencié es Sciences
Ancien Interne des Hôpitaux de Paris

JURY : MM. P. FLEURY, *Président.*
R. FABRE, *Doyen.*
G. VALETTE, *Professeur.*

IMPRIMERIE DE LA LYS
VENDIN-LE-VIEIL - (P.-de-C.)

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

Administration

MM. FABRE	Doyen, ✻, ⊛ I.
SOMMELET	Assesseur, ✻, ⊛I.
H.-J.LIONNET	Secrétaire, ⊛I.

Professeurs

MM. N...	Chimie minérale.
SOMMELET, ✻, ⊛I.	Chimie organique.
FABRE, ✻, ⊛I.	Toxicologie.
DELABY, ✻, ⊛I.	Pharmacie chimique.
PICON, ✻, ⊛I.	Physique.
MASCRE, ✻, ⊛I.	Histoire naturelle des Médicaments simples d'origine végétale.
PARIS	Botanique générale.
FLEURY, ✻, ⊛ I	Chimie biologique.
SARTORY C. ✻, ⊛ I	Microbiologie.
JANOT, ⊛A.	Pharmacie galénique.
CHARONNAT, ⊛I.	Chimie analytique.
VALETTE, ⊛ I	Zoologie appliquée.
BEDEL, ✻, ⊛ I.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
GUILLOT	Professeur sans chaire.

Doyens honoraires : MM. RADAIS, O.✻, ⊛I. — GUERIN, O.✻, ⊛I.

Professeurs honoraires : MM. DELEPINE, O.✻, ⊛I., et LEBEAU, O.✻, ⊛I, Membres de l'Institut.

MM. PERROT, C.✻, ⊛I., COUTIERE, O.✻, ⊛I.
BOUGAULT, O.✻, ⊛I., LUTZ, ✻, ⊛I.
GORIS, O.✻, ⊛I., HERISSEY, O.✻, ⊛I.
LAUNOY, O.✻, ⊛I.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Maîtres de conférences

MM. GAUTHIER. ⊛ I	Sciences physiques.
RAOUL	Sciences naturelles.
DAVID ⊛ I	Sciences naturelles.
DOMANGE, ⊛ I	Sciences physiques et chimiques.

Chefs des travaux pratiques

MM. HARISPE, trav. pratiques de 1re année.	Chimie générale et pharmaceutique.
MORETTE, trav. prati de 2e et 3e année.	Chimie analytique.
CRETE	Micrographie.
CORRIEZ, ⊛ I	Physique.
Mlle LAMBIN ⊛ I	Microbiologie.
M. COURTOIS	Chimie biologique, Bromatologie et Pharmacie chimique

Bibliothécaire en chef : M. GARNIER, ⊛A.

Bibliothécaire : Mlle LAVAUD, ⊛A.

A MA FEMME

A MES PARENTS

A MES CAMARADES D'INTERNAT

A Monsieur le Professeur agrégé

JEAN CHEYMOL

PHARMACIEN DES HOPITAUX DE PARIS

Hommage de reconnaissance.

A mon Président de Jury

Monsieur le Professeur **PAUL FLEURY**

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE

PHARMACIEN DES HOPITAUX PSYCHIATRIQUES DE LA SEINE

Hommage respectueux.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE

Chimie du Prégnandiol

CHAPITRE I

Le Prégnandiol non combiné 7
a) Propriétés physiques 7
b) Propriétés chimiques 9
Substances voisines isolées des urines 14
Réactions colorées 16

CHAPITRE II

Le Prégnandiol glucuronide 18
a) L'acide prégnandiol glucuronique 18
b) Le prégnandiol glocuronate de sodium 21
c) Réaction phosphovanillique 23
d) Préparation du prégnandiolglucuronide et du prégnandiol libre 27

DEUXIEME PARTIE

Dosage du Prégnandiol

CHAPITRE I

Méthode de VENNING 32
Exposé 33
Discussion et travaux personnels 37

CHAPITRE II

Méthodes dosant l'acide glucuronique libéré par l'hydrolyse du prégnandiol glucuronite 47
a) Méthode de Crismer et Florisin 48
b) Méthode de Jayle 50
c) Méthode d'Allen et Viergiver 59

CHAPITRE III

Méthode de Beall 63

CHAPITRE IV

Méthode d'Astwood et Jones 69

CHAPITRE V

La réaction de Talbot et les méthodes qui en dérivent 74
a) Méthode de Talbot, Berman, Mac Lachlan et Wolfe .. 74
b) Méthode qualitative de Guterman 76

CHAPITRE VI

Méthodes dosant le prégnandiol libéré par hydrolyse enzymatique 77
a) Méthode d'isolement de Weil 77
b) Technique de Veitch, Milone et Everitt 78
c) Méthode de Talbot, Ryan et Wolfe 79

TROISIEME PARTIE

Choix d'une technique - Méthode proposée

CHAPITRE I

La réaction du pentachlorure d'antimoine 85

CHAPITRE II

Méthode de dosage du prégnandiol total 96
Exposé 96
Discussion 100

CHAPITRE III

Résultats cliniques obtenus avec la méthode 106

QUATRIEME PARTIE

Etude physiologique du Prégnandiol

CHAPITRE I

Elimination urinaire 117
1°) En dehors du cycle menstruel et de la gestation 118
2°) Au cours du cycle menstruel 120
3°) Au cours de la gestation 123
4°) Elimination chez les animaux 134

CHAPITRE II

Origine et transformation du prégnandiol 137
1°) Importance du placenta 138
2°) Origine corticosurrenale 140
3°) Transformation de la progestérone injectée 142
4°) Rôle de l'uterus dans le métabolisme de la progestérone 145
5°) Lieu de la glucuroconjugaison 143

CONCLUSIONS 147

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE 151

INTRODUCTION

Bien que le prégnandiol n'occupe qu'une place secondaire parmi les stéroïdes sexuels, son étude a fait l'objet depuis une quinzaine d'années de nombreuses publications, pour la plupart anglo-saxonnes. Fait remarquable dans l'histoire de ce groupe de corps, les travaux ont été réalisés par les seuls moyens d'investigation chimique.

Le prégnandiol en effet ne possède pas d'activité physiologique et apparaît dans les urines comme une substance d'élimination, terme ultime du métabolisme de la progestérone.

Le dosage chimique du prégnandiol présente de ce fait un intérêt biologique et clinique certain, car, malgré les progrès représentés par la microméthode biologique d'Hoffmann et Lam (1941), *le dosage de la progestérone dans l'organisme vivant, reste difficile. En dosant le prégnandiol, le laboratoire peut étudier indirectement le fonctionnement du corps jaune de menstruation et de gravidité, déceler les phénomènes pathologiques, prévenir certains accidents abortifs. La persistance et l'augmentation du prégnandiol éliminé après la fécondation permettent éventuellement le diagnostic précoce de la grossesse par un procédé chimique. Enfin le prégnandiol provenant dans certains cas du métabolisme des hormones corticosurrénales peut prendre rang parmi les moyens d'investigation de cette glande endocrine.*

Tout ceci réclame des moyens analytiques précis. Malheureusement le prégnandiol, par sa constitution, a peu d'affinités chimiques. La première méthode de dosage (VENNING 1937) *encore la plus employée, se contente de peser le produit purifié extrait des urines sous sa forme glucuro-conjuguée. D'autres techniques ont été publiées depuis. Toutes demeurent d'exécution délicate.*

Nous avons mené de pair, dans ce travail, l'étude de l'élimination et des moyens de dosage du prégnandiol.

L'étude de l'élimination, effectuée principalement avec la méthode de VENNING, nous a permis de vérifier et de préciser les conclusions généralement admises.

L'étude critique des moyens de dosage connus alors en France nous a incité à établir une nouvelle technique analytique (1945) *utilisant une réaction colorée du prégnandiol que nous avons mise au point au cours de l'année* 1944.

Voici le plan suivi au cours de ce travail :

PLAN

1. - Caractères physiques et propriétés chimiques - Réactions colorées :
   a) du prégnandiol ;
   b) de l'acide prégnandiolglucuronique et du prégnandiol glucuronate de sodium.

2 - Méthodes de dosage :
   a) Méthodes dosant le prégnandiol conjugué par gravimétrie ;
   b) Méthodes dosant le prégnandiol libéré par hydrolyse acide :
      par gravimétrie ;
      par colorimétrie ;
   c) Méthodes dosant la prégnandiol libéré par hydrolyse enzymatique.

3 - Technique personnelle de dosage du prégnandiol :
   a) Réaction colorée au pentachlorure d'antimoine ;
   b) Méthode de dosage ;
   c) Résultats obtenus ;

4 - Etude physiologique :
   I - Elimination du prégnandiol :
      a) Chez la femme en dehors du cycle menstruel ;
         au cours du cycle menstruel ;
         au cours de la gestation ;
         au moment de l'accouchement ;
      b) Chez les animaux.
   II - Origine du prégnandiol :
      Placenta ;
      Corps jaune ;
      Cortex surrénal.

Je voudrais remercier ici tous ceux qui ont bien voulu m'aider à réaliser cette thèse.

Ma profonde reconnaissance s'adresse d'abord à Monsieur le Professeur agrégé Jean CHEYMOL, Pharmacien des Hôpitaux de Paris. Ce travail, qu'il a inspiré, réalisé dans son laboratoire de l'Hôpital Tenon, lui doit beaucoup. Il a été pour moi, au cours de mes années d'Internat, un exemple et un guide.

Monsieur le Professeur Paul FLEURY a bien voulu me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Sa grande bienveillance et ses conseils ont eu pour moi beaucoup de prix.

Je remercie également profondément Monsieur le Doyen René FABRE et Monsieur le Professeur Guillaume VALETTE, membres du jury, de l'intérêt qu'ils m'ont porté.

Je n'oublierai pas mon camarade d'Internat, Robert HENRY, assistant à la Faculté de Médecine, pour son aide affectueuse. Le personnel du Laboratoire, de la Pharmacie et de la Maternité de l'Hôpital Tenon m'a toujours facilité la tâche au cours de ces années difficiles. Je l'en remercie sincèrement.

PREMIERE PARTIE

CHIMIE DU PREGNANDIOL

CHAPITRE I

LE PREGNANDIOL NON COMBINE

Le prégnandiol (ou prégnane diol) est un des corps les plus anciennement connus dans la série des stéroïdes sexuels puisqu'il a été découvert dès 1929. Il fut extrait de l'urine de grossesse au cours des travaux qui conduisirent la même année à l'isolement de l'oestrone.

Trois groupes d'auteurs l'obtinrent à peu près en même temps : MARRIAN (1929)[104] à qui revient la priorité de la découverte, DINGEMANSE, DE JONGH, KOBER, LAQUEUR (1930) [37] et BUTENANDT (1930)[16]. Celui-ci établit sa constitution et lui donna un nom (de praegnans : gravide).

Il s'agit d'un dérivé cyclopentano hydrophénanthrénique de formule brute $C_{21}H_{36}O_2$ (P.M. : 320) possédant un noyau saturé (prégnane) et deux fonctions alcool secondaires. Dans les urines, il se trouve pour la plus grande partie à l'état de glucuro-conjugué.

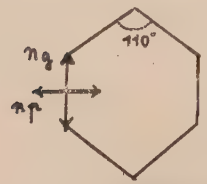
PROPRIETES PHYSIQUES

Aspect cristallin.

Le prégnandiol pur se présente sous forme de petits cristaux hexagonaux incolores d'un millimètre environ. Ces cristaux s'obtiennent assez facilement à partir des solutions alcooliques. Nous avons

pu obtenir une fois avec un produit impur (P.F. 232°) de belles lamelles hexagonales atteignant 2 à 3 mm. (fig. 1).

Les cristaux correspondant au produit pur (P.F. 236°) (fig. 2) appartiennent au système orthorhombique. L'examen en lumière polarisée indique un allongement positif correspondant au schéma ci-contre (*). L'angle au sommet mesure 110° (*).



ng : grand indice = petites longueurs d'onde.

np : petit indice = grandes longueurs d'onde.

Point de fusion.

La plupart des auteurs indiquent pour le prégnandiol pur un point de fusion de 236°-237°. BEALL indique 237°-237°5. Nous avons personnellement obtenu un produit fondant à 236° au bloc Maquenne.

Pouvoir rotatoire.

Le pouvoir rotatoire a été mesuré par ALLEN [2] et BEALL [8]. Il est dextrogyre.

$$[\alpha]_D^{20} = +27°,4 \text{ (dans l'alcool éthylique) } l = 4 \quad c = 0,493\ \%$$

$$[\alpha]_{5461}^{20} = +30°,4 \quad »$$

Solubilités.

D'une manière générale, le prégnandiol est peu soluble. Insoluble dans l'eau et dans la soude, il est légèrement soluble dans l'éther. (ODELL et MARRIAN [109]), soluble dans l'acétone, l'alcool éthylique, l'alcool méthylique, l'alcool butylique (BUTENANDT) [16], le benzène, le toluène, le chloroforme, l'éther de pétrole (BEALL) [8].

La solubilité dans ces divers solvants est bien meilleure à

(*) L'examen cristallographique a été fait par M. WYART, Professeur de Minéralogie à la Faculté des Sciences de Paris. Je le remercie vivement pour son obligeance et son aimable accueil.

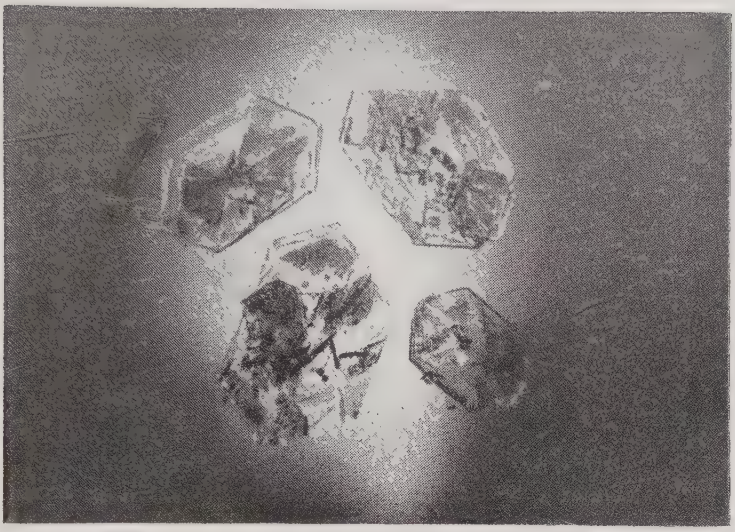


Figure N. 1

Cristaux de Prégnandiol impur (*P.F.* 232°) *grossis* 17 *fois*

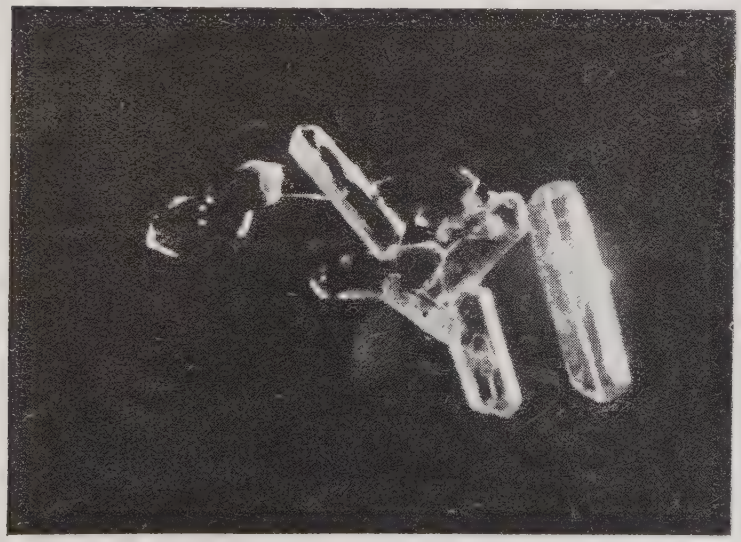


Figure N. 2

Cristaux de Prégnandiol pur (*P.F.* 236°) *grossis* 32 *fois*

chaud qu'à froid, ce qui a permis de l'obtenir cristallisé à partir de l'éther, de l'acétone, de l'éther de pétrole, de l'alcool.

Toutes ces solubilités demeurent faibles (inférieures à 1 pour 100 à froid selon MARRIAN).

TRAVAUX PERSONNELS.

Nous avons essayé d'évaluer les solubilités dans des solvants usuels. Les résultats sont indiqués ci-dessous, en gramme de prégnandiol dissous pour 100 centimètres cubes de solvant. Ces valeurs obtenues à la température du laboratoire (+20° à +25°), sont certainement sujettes à des erreurs, les quantités de prégnandiol et de solvant employées étant très minimes (quelques milligrammes de prégnandiol pour chaque essai). Nous les donnons pour fixer un ordre de grandeur.

Alcool méthylique 99c - 100c	:	0,80 g.	dissous dans	100 cm3
Alcool éthylique 95c	:	1,00 g.	»	»
Alcool butylique normal	:	0,19 g.	»	»
Oxyde d'éthyle	:	0,15 g.	»	»
Acétone	:	0,2 g.	»	»
Benzène	:	0,09 g.	»	»
Toluène	:	0,07 g.	»	»
Acétate d'éthyle	:	0,2 g.	»	»
Ether de pétrole	:	0,02 g.	»	»

PROPRIETES CHIMIQUES

1°) CONSTITUTION

Travaux de MARRIAN. [104]

MARRIAN (1929) isole le prégnane diol au cours de l'extraction de la folliculine. Extrayant par l'éther l'insaponifiable obtenu à partir de la fraction othérosoluble de l'urine de femme enceinte proche du terme, il obtient un résidu peu soluble dans l'éther ; ce résidu repris par l'acétone bouillante donne par refroidissement un solide blanc cristallin « très semblable superficiellement au cholestérol » de point de fusion 233° à 235°, peu soluble dans les divers solvants organiques (moins de 1 pour 100). L'analyse immédiate de ce corps le conduit à la formule brute C_{19} H_{32} O_2 ou C_{20} H_{32} O_2

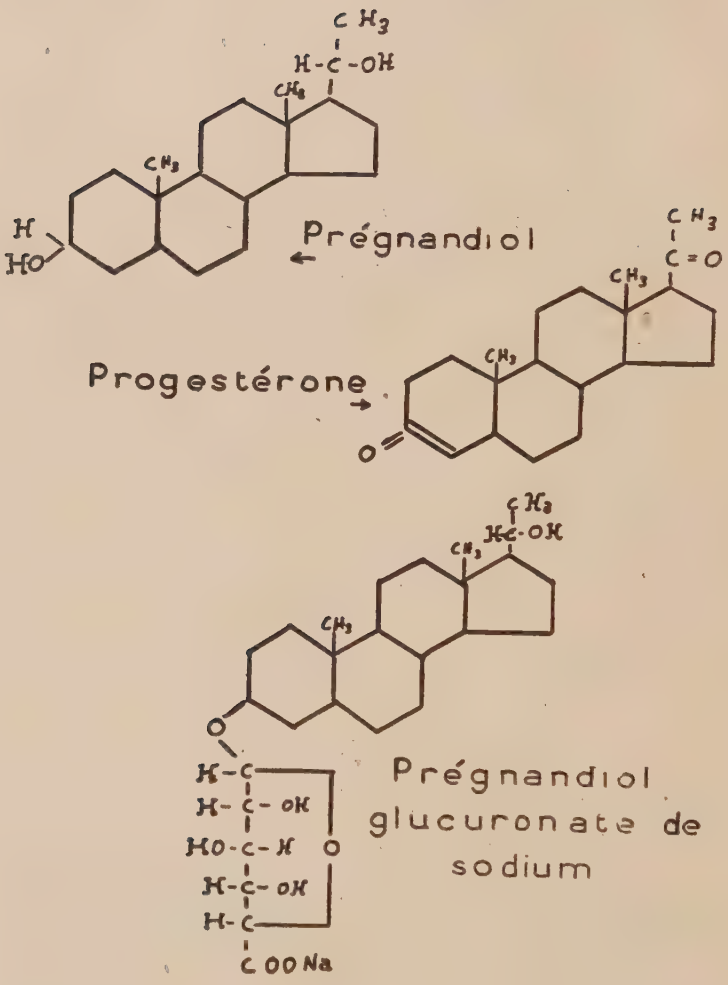

Prégnandiol
Progestérone
Prégnandiol glucuronate de sodium

Figure N. 3

La présence des deux atomes d'oxygène dans la molécule, jointe à la solubilité faible dans l'éther, relativement plus grande dans l'alcool, fait prévoir deux fonctions alcool, opinion confirmée par la formation d'un diacétate de P.F. 177°,5-178°,5.

Travaux de BUTENANDT. [16] [17]

BUTENANDT (1930) isole aussi le prégnandiol de l'insaponifiable des urines gravidiques destinées à l'extraction de la folliculine. Il part « d'huiles hormonales » déjà purifiées ne contenant que la fraction ethérosoluble de l'insaponifiable (appelait extrait hormonal I).

Cet extrait est traité par l'alcool méthylique en présence d'éther de pétrole. La phase alcoolique est extraite par l'éther hydraté (extrait hormonal II). Celui-ci est partagé entre l'alcool à 70° et le benzène. La phase benzénique (extrait hormonal III) traitée par l'acide chlorhydrique dilué est extraite à l'éther. La solution éthérée lavée au carbonate de sodium puis à la soude cède aux liqueurs alcalines la folliculine. Le prégnandiol, composant neutre, reste dans l'éther.

L'étude chimique du produit ainsi isolé (P.F. 235°) conduit BUTENANDT aux conclusions définitives suivantes :

Poids moléculaire 320.

Formule brute $C_{21} H_{36} O_2$

Présence dans la molécule de deux fonctions alcool secondaires (déjà signalées par MARRIAN).

Un groupement CHOH - CH_3 .

Un noyau cyclopentenophénanthrène.

L'existence de deux fonctions alcool découle en effet de la préparation du dérivé diacétylé du prégnandiol ; d'autre part, l'oxydation ménagée par l'acide chromique à froid conduit à une dicétone saturée de formule $C_{21} H_{32} O_2$, (P.F. 123°), donnant une dioxime ; il s'agit donc de deux fonctions alcool secondaire.

Cette dicétone, la prégnandione, traitée par l'iode en milieu alcalin donne la réaction à l'iodoforme, caractéristique d'un groupe COCH correspondant dans le prégnandiol à un groupe CHOH - CH_3 .

D'autre part, l'oxydation énergique par l'acide chromique conduit à l'acide cétodicarbonique de formule $C_{21} H_{32} O_5$ (P.F. 270°),

donnant des esters diméthyliques de P.F. 113_9. La prégnandione, dicétone correspondante, doit donc posséder une fonction cétone dans un noyau hydrogéné et non aromatique. Enfin, l'hydrogénation conduit à un carbure saturé, le prégnane $C_{21}H_{36}$ (P.F. 83°,5 ; $[\alpha]_D^d = +21°$). L'existence d'un noyau à quatre cycles hydrogénés voisin de celui du cholestérol et de celui de l'acide cholanique est donc probable.

Le prégnane $C_{21}H_{36}$ fut préparé également à partir de l'acide cholanique [19]. Cette transformation obtenue par suppression de la chaîne latérale, sans toucher au noyau, confirme l'identité des noyaux de l'acide cholanique, du prégnane et du prégnandiol.

On a pu en déduire que le prégnandiol appartient à la série du coprostane.

2°) ISOMÉRIES

Le prégnandiol présentant 9 carbones asymétriques, pourrait posséder, selon la théorie, 1024 stéréosomètres. La réalité est heureusement plus simple et en pratique limitée à trois centres d'isoméries, les carbones 3, 5 et 17 (JAYLE [71]).

La position de l'hydrogène lié au carbone 5, par rapport au groupement méthyle en 10, permet de distinguer le prégnandiol de l'alloprégnanediol (trans.). Celui-ci existe également dans l'urine (HARTMAN et LOCHER [57]), dans la proportion du sixième du prégnandiol total. On peut le séparer du prégnandiol grâce à la plus grande solubilité de son diacétate de P.F. 139°5

$[\alpha]_D^{20} = +18°$ dans le benzène (BEALL [8]).

La position de l'oxhydrile fixé au carbone 3, par rapport au groupement méthyle en 10, de même que celle de l'oxhydrile fixé en 17 par rapport au groupement méthyle en 13, permettent de distinguer l'alloprégnandiol 3 α 20 α (cis) de l'alloprégnandiol 3 β 20 α (oxhydrile 3 en trans.).

Les 8 prégnandiols isomères (3 α 20 α ; 3 α , 20 β ; 3 β 20 α ; 3 β 20 β ; de même pour la série allo) ont été extraits ou préparés (isomérisation par action du sodium dans le xylène) ; les 8 prégnanolones correspondantes également [89].

Le prégnandiol normal correspond à la définition 3 20 α ; il ne précipite pas en effet par le digitonoside, ce qui indique un groupe OH épi (cis ou α ; carbone 3).

3°) DÉRIVÉS DU PRÉGNANDIOL

Le noyau étant saturé, les transformations porteront essentiellement sur les deux fonctions alcool.

Nous avons déjà vu qu'acétylé le prégnandiol donne un diacétate (P.F. = 179° - 180° ; [α] D = + 34°,3 dans le benzène (BEALL [8]).

Par fractionnement sur alumine du produit brut d'acétylation, HIRSCHMANN [64] a pu séparer le prégnandiol monoacétylé en 3. A partir de ce monoacétate il a préparé le Δ 17 prégnénol 3 α et le prégnanètrioi 3 α , 17, 20.

L'OXYDATION BRUTALE par l'acide chromique conduit à l'acide cetodicarbonique $C_{21} H_{32} O$ par ouverture du cycle A.

L'OXYDATION MÉNAGÉE (acide chromique) fournit la prégnane ol 20 one 3, l'oxydation plus poussée, la dicétone correspondante, prégnane dione 3,20, donnant la réaction de l'iodoforme (groupe $CO - CH_3$).

Ces transformations sont à l'origine de la SYNTHÈSE DE LA PROGESTÉRONE A PARTIR DU PRÉGNANDIOL (BUTENANDT [22]). Celui-ci est oxydé en prégnanolone. Par action du brome, un atome d'halogène se fixe par substitution à proximité du groupe cétonique, en 4. L'hydroxycétone bromée est transformée par oxydation chromique en dicétone (bromo 4 prégnandione). Sous l'action de la pyridine anhydre à l'ébullition, il y a départ d'acide bromhydrique et formation d'une dicétone éthénique, la Δ 4,5 prégnénedione, identique par ses propriétés chimiques et physiologiques à la progestérone naturelle.

Inversement l'hydrogénation de la progestérone conduit au prégnandiol 3 α 20 β et à l'alloprégnandiol 3 β 20 β .

La PREGNANDIONE (ou prégnanedione), réduite par la méthode de CLEMMENSEN,donne le prégnane $C_{21} H_{36}$.

Hydrogénées en présence d'acides minéraux la prégnandione et l'alloprégnandione donnent respectivement naissance au prégnandiol 3 β 20 β et à l'alloprégnandiol 3 α 20 β .

La réduction catalytique partielle dans l'alcool s'arrête à

l'ÉPIPRÉGNANOL 3 ONE 20, qui existe dans l'urine de grossesse [86]. Cette dernière peut également être préparée par oxydation du prégnandiol partiellement acétylé [87], ainsi que la prégnanol 20 one 3 [91].

L'alloprégnandiol dans ces conditions conduit à l'épialloprégnanol 3 one 20 [86] [89] [93].

La réduction partielle de l'alloprégnandione conduit de même à l'alloprégnanol 3 α one 20 et à l'alloprégnanol 3 β one 20 [97].

Les acides favorisent la formation du 3 β ol et l'absence d'acide la forme 3 α ol [95].

Les PREGNANOLONES (alloprégnanol 3 β one 20, prégnanol 3 β one 20, prégnanol 3 α one 20) permettent d'obtenir des ACIDES ÉTIOCHOLANIQUES : traitement par le benzaldéhyde et l'éthylate de sodium dans l'alcool absolu ; ce qui donne des dérivés « benzal » en 21 ; ceux-ci, acétylés puis oxydés par l'anhydride chromique, se transforment en acides étiocholaniques substitués avec un rendement de 70 pour cent [102].

Inversement l'acide 3 oxybisnorcholanique a permis de préparer l'alloprégnane ol 3 one 20 [20].

Le prégnanol 3 α one 20 a servi à préparer également le prégnane one 3, le prognane ol 3 et la Δ 4 prégnénone 3 [94] [77].

4°) SUBSTANCES VOISINES ISOLÉES DES URINES

Toute une série de corps a pu être isolée des urines. Ils y existent en petite quantité. Les uns dérivent du prégnane, les autres de l'alloprégnane. Tous les dérivés du prégnane, sauf le prégnènediol, sont du type épi (α en 3), et ne précipitent pas par le digitonoside. Par contre certains dérivés de l'alloprégnane sont du type 3 β et précipitent le digitonoside. Nous citerons pour mémoire les dérivés de la série de « l'urane » isolés par MARKER, l'urane ayant la même structure chimique que le prégnane dont il ne se différencie que par la disposition du carbone 9 [98].

Tous ces dérivés sont dépourvus d'activité physiologique. Seule la progestérone, dérivée du prégnane, possède une activité mais on ne la trouverait dans l'urine que par quantités infimes (0,05 mg. par litre au plus) (LOEWE et VOSS [79]).

La plupart de ces travaux ont été réalisés par R. E. MARKER et ses collaborateurs.

1 - *Dérivés du prégnane.*

Prégnanol 3 : dérivé le plus réduit de l'urine de femme enceinte [71].

Prégnandiol 3 α 20 α : objet principal du présent travail.

Prégnandiol 3 β 20 α : d'origine pathologique (tumeurs du cortex surrénal [105].

Prégnandiol 3 α 17, one 20 : probablement d'origine surrénale isolé en 1945 [80].

Epi prégnanol 3, one 20 : urine de femme enceinte [86] urine de truie gravide [100] .

Prégnanedione 3,20 : urine de jument gravide [97] .

Δ 5, 6 prégnénediol 3,20 : urine de jument gravide [99]

Δ 5, 6 prégnéne ol 3 one 20 [72]

Prégnanetriols :

Prégnanetriol A : dont le 3e oxydrile est probablement en 11 du fait de son inactivité chimique : 3-11-20 [88]

Prégnanetriol B : correspondant à la formule : 3 α 4 β 20 α (MARKER[92]) ou à la formule 3 α 6 β 20 α (ODELL et MARRIAN [110] 1938). Ce corps est probablement identique au triol isolé, par HASLEWOOD, MARRIAN et SMITH [58] en 1934 à partir des mêmes urines de jument gravide. .

Prégnanetriol 3 α , 17, 20 · isolé de l'urine de femme enceinte présentant le syndrome adrénogénital [23] [65] .

Prégnane-tétrol : urine de jument gravide [87]

2 - *Dérivés de l'alloprégnane.*

Alloprégnandiol 3 α 20 α : [57] [8] représenterait un sixième du prégnandiol total dans l'urine humaine, la moitié dans l'urine de taureau [103] $[\alpha]_D^{20} = +17°$ dans l'éthanol P.F. 243° - 245°.

Alloprégnandiol 3 β 2 α :	urine de taureau [103] et de jument gravide [99].. Urine de femme enceinte [84]
Alloprégnandiol 3 α 20 β :	urine de femme enceinte.
Alloprégnane ol 3 β one 20:	urine de femme au moment du travail [112]. Urine de jument gravide [97] de truie gravide [100]. La 3 - 20 alloprégnanolone a été isolée de la glande surrénale [10] [9].
Epialloprégnanol 3 α one 20:	activité androgène (urine de femme enceinte [90]) a été obtenu par synthèse [89] à partir de l'acide chloroallocholanique.
Alloprégnandione°:	urine de jument gravide [97],

3 - *Dérivés de l'urane.*

(isolés de l'urine de jument gravide) [98] [101].

Urane diol, 11 ; urane ol 11 one 3 ; uranetriol 3, 11, 20, urane tétrol.

Il est probable que ces diverses substances ne proviennent pas toutes du métabolisme lutéal. Certaines ont un caractère pathologique et peuvent être attribuées au métabolisme corticosurrénal ; elles sont à inclure dans les nombreux stéroides isolés au cours du métabolisme de cette glande endocrine (voir MASON et KEPLER [105]).

5°) RÉACTIONS COLORÉES DU PRÉGNANDIOL

1 - *Réaction de LIEBERMAN.*

Selon MARRIAN [104], la réaction de LIEBERMAN appliquée au prégnandiol fournirait une coloration rouge brun. BUTENANDT [16] observe également cette coloration.

Nous avons essayé sans succès de répéter ces expériences. L'addition d'anhydride acétique et d'acide sulfurique à une solution chloroformique de prégnandiol (1 mgr.) donne naissance à une faible coloration jaune. De très faibles colorations brunes n'ont été obtenues qu'en ajoutant une grande quantité d'acide sulfurique, mais nous ne pensons pas que cela puisse être appelé réaction de LIEBERMAN.

2 - *Réaction de TALBOT* [128]

Si on ajoute à du prégnandiol de l'acide sulfurique, il se développe une coloration jaune orange. La réaction s'effectue sur le résidu d'évaporation d'une solution alcoolique de prégnandiol.

Cette réaction est à la base de plusieurs méthodes analytiques (voir page 74).

3 - *Réaction au pentachlorure d'antimoine (technique personnelle)*.

Si on ajoute à une solution chloroformique de prégnandiol une solution chloroformique de pentachlorure d'antimoine, il se développe une coloration brune plus ou moins intense. L'addition de quelques gouttes d'un alcool (alcool méthylique ou éthylique), transforme cette coloration brune en une coloration verdâtre, proportionnelle à la concentration du prégnandiol.

Cette réaction colorée nous a permis d'établir une méthode de dosage. Elle est décrite plus largement dans la III[e] Partie.

CHAPITRE II

LE PREGNANDIOLGLUCURONIDE

A la suite des travaux de COHEN [28] et ADLER [1] montrant que la plupart des stéroïdes sexuels existent dans l'urine sous forme conjuguée hydrolysable, ODELL et MARRIAN en 1936 [109] isolent la forme conjuguée du prégnandiol. La même année VENNING et BROWNE [136] établissent sa constitution glucuronique : c'est le prégnandiol glucuronate de sodium. Ces corps constituent dans l'urine des formes d'élimination et de détoxication (*).

ACIDE PREGNANDIOLGLUCURONIQUE

CONSTITUTION

L'acide glucuronique se fixe au prégnandiol par une liaison éther-oxyde, entre l'oxydrile pseudoaldéhydique de l'acide glucuronique et un oxydrile du prégnandiol. L'analyse du produit d'acétylation du prégnandiol glucuronide a permis récemment de déterminer qu'il s'agit de l'oxydrile lié au carbone 3 du noyau stérolique (HEARD, HOFFMAN, MACK 1944 [60]). L'hydrolyse possible par l'émulsine montre qu'il s'agit d'un β glucuronide. Dans le glucuronide ainsi constitué le groupe carboxyle de l'acile glucuronique reste libre, ce sera donc l'acide prégnandiolglucuronique ou prégnandiol 3 β *d* glucuronide (P.F. 178°-180°).

SYNTHÈSE :

La synthèse réalisée récemment (HUEBNER, OVERMAN, LINK 1944 [70]) confirme la liaison glucuronique en 3. Les auteurs

(*) Un autre mécanisme de détoxication est la formation de sulfoconjugués tels que l'œstrone sulfate de sodium.

ont couplé 1 mg. de prégnandiol acétylé en 20 [21] avec l'ester méthylique de l'acide acéto-bromo *d* glucuronique, par agitation prolongée dans le benzène en présence d'oxyde d'argent. On obtient ainsi l'ester méthylique du prégnandiol 20 acétyl, 3 triacétyl β *d* glucuronide. Ce corps, cristallisé dans l'alcool, chauffé avec la soude 0,5 N, donne le prégnandiol 3 β *d* glucuronate de sodium identique au produit naturel extrait des urines (P.F. du produit synthétique 274° — 275°). On passe facilement à l'acide prégnandioglucuronique (P.F. 171°, 172°).

Le composé acétylé intermédiaire a pu être également réalisé par méthylation et acétylation du prégnandiolglucuronide naturel.

Les auteurs ont préparé de même le prégnandiol 3 β *d* glucoside.

HYDROLYSE

L'hydrolyse du prégnandiol glucuronide peut se faire par les acides ou par les enzymes.

1 - *Hydrolyse acide.*

L'hydrolyse par l'acide chlorhydrique a été expérimentée par plusieurs auteurs ; elle est utilisée au cours de certaines techniques de dosages. Les rendements varient en fonction de l'acidité, de la température atteinte et du temps de chauffage. On a essayé des acidités faibles (pH 1) et fortes (10 pour cent d'acide pur) des températures de 80° à 120° maintenues de quelques minutes à plusieurs heures. Les meilleurs résultats paraissent obtenus par le chauffage à l'ébullition, de courte durée (quinze minutes), en présence d'une forte proportion d'acide (10 pour cent) (ASTWOOD et JONES [5]. De toute façon l'opération n'est pas parfaite et le rendement dépasse rarement 70 pour cent. Il semble qu'il y ait destruction d'une partie du prégnandiol libéré.

2 - *Hydrolyse enzymatique* (*)

Certains auteurs se sont efforcés de résoudre le problème par l'emploi d'enzymes. WEILL en 1938 [144] utilise les diastases d'origine bactérienne, apparaissant dans l'urine ; il se contente de con-

(*) Voir page 77.

server celle-ci à l'étuve à 37° un temps suffisant. VEITCH, MILONE, EVERITT [133] (1938), considérant le prégnandiolglucuronide comme un glucoside, emploient l'émulsine à pH 6, directement sur l'urine, avec de bons résultats.

Plus récemment, on a utilisé une enzyme plus spécifique. TALBOT, RYAN, WOLFE [130] (1943), après avoir employé sans grand effet la glucuronidase extraite de la rate de bœuf par FISHMAN [42] préparent une enzyme à partir du foie de rat ; ils obtiennent ainsi des résultats très intéressants.

SELS DE L'ACIDE PRÉGNANDIOLGLUCURONIQUE

Les sels alcalins et d'une façon générale la plupart des sels de l'acide prégnandiolglucuronique sont solubles. Seuls les sels alcalino-terreux (Ba, Ca, Sr) se distinguent par leur faible solubilité; particulièrement le prégnandiolglucuronate de Baryum (4,5 mgr. pour 100 dans l'alcool absolu). Les trois sels alcalino-terreux cristallisent en lamelles fondant à 272° avec décomposition.

Par contre, l'addition à une solution de prégnandiol glucuronate de sodium dans l'alcool à 50c d'ions cuivre, magnésium, zinc, mercure, plomb, chrome, fer, cobalt, ne provoque aucune précipitation. (U. WESTPHAL [147 bis]. Cependant pour ALLEN et VIERGIVER le sel de plomb serait insoluble. Ces auteurs ont utilisé la précipitation du prégnandiolglucuronide par le nitrate de plomb pour l'isoler en vue du dosage. (Voir page n° 59).

Nous même avons obtenu des résultats plaidant pour la solubilité du sel de plomb, avec le réactif de Courtonne. Un volume défini d'urine de femme enceinte était déféqué par l'addition de réactif de Courtonne (1/10e du volume de l'urine). Le prégnandiol était dosé par la Méthode de VENNING dans le filtrat et dans une quantité égale de la même urine non déféquée. Ces résultats sont exprimés dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU N° I

	urine non déféquée (a)	urine déféquée (b)	perte pour 100
1er cas.	37,6	30,4	17,
2e cas.	16,5	13,5	19,2

a) dosages faits sur 500 cm^3 d'urine, additionnée de 50 cm^3 de réactif de COURTONNE et de 20 gr. de sulfate de sodium puis filtrée.

b) dosages faits sur 500 cm^3 de la même urine non déféquée.

Les résultats sont exprimés en milligrammes de prégnandiol-glucuronate de sodium. La précipitation serait donc assez faible (moins de 20 pour cent) ; il ne s'agit peut-être que d'impuretés.

PREGNANDIOLGLUCURONATE DE SODIUM

Le prégnandiolglucuronate de sodium $C_{27} H_{43} O_8 Na, H_2 O$ (P.M. = 536) représente dans l'urine la forme conjuguée du prégnandiol (*).

On ne sait pas exactement dans quelle proportion la forme non conjuguée l'accompagne. Les quelques indications fournies par ODELL, MARRIAN [109] et BEALL [8] varient de 10 à 50 pour cent. La difficulté provient de la facilité d'hydrolyse du glucuronide, soit au cours des traitement analytiques, soit du fait de la mauvaise conservation de l'urine. Il semble très probable que l'urine fraîchement émise ne contient qu'une faible proportion de prégnandiol libre.

Aspect.

Le prégnandiolglucuronate de sodium cristallise moins bien que le prégnandiol ; il se présente fréquemment sous l'aspect d'une poudre blanche amorphe. Cristallisé à partir de solutions alcooliques, il est constitué par des lamelles cristallines très minces, transparentes, aux contours souvent mal définis. Ces cristaux dérivent d'un prisme droit dont la base est un losange de 127° environ. Leurs propriétés optiques sont celles d'un cristal positif de biréfringence extrêmement faible. (Voir GAUDREFOY in ROBEY [117]).

Point de fusion.

VENNING [134] indique un point de fusion compris entre 268° et 271° avec décomposition, dégagement de vapeur.

Ce point de fusion varie beaucoup avec la pureté du produit. Au cours de purifications poussées du prégnandiolglucuronate de

(*) Prégnandiolglucuronidate de sodium (terminologie anglo-saxonne)

sodium extrait des urines, nous avons observé pour des produits cristallisés, des points de fusion nettement supérieurs à celui indiqué ci-dessus, atteignant 290° — 291° (Bloc Maquenne). Ceci n'a pas été sans nous troubler, et c'est avec intérêt que nous avons pris connaissance des conclusions similaires de M. F. JAYLE [79]. Celui-ci attribue ces différences à la présence, dans le précipité final de VENNING de deux fractions distinctes, correspondant vraisemblablement aux séries prégnane et alloprégnane. La fraction la plus importante précipite la première et fond à 292°, la deuxième fraction fond à 271° — 272°. Le produit synthétique [70] fond à 274° — 275° (Prégnandiol 3 β d glucuronate de Na).

Absorption par l'acide benzoïque.

BEALL [8] a étudié l'adsorption du prégnandiolglucuronate de sodium par l'acide benzoïque. Il ajoute à des urines de grossesse du benzoate de soude et de l'acide chlorhydrique. Le pH du milieu est ainsi amené à diverses valeurs entre pH 1 et pH 5. Le maximum d'adsorption se fait entre pH 2,0 et pH 2,5. L'adsorption est à peu près nulle à pH 1 et à pH 5.

Solubilités.

Nous avons évalué la solubilité du prégnandiolglucuronate de sodium dans quelques solvants usuels. Ces essais ont été effectués à la température du laboratoire (24° environ), avec un produit purifié (P.F. 280°). Ces mesures effectuées avec de très faibles quantités sont sujettes aux réserves déjà formulées plus haut et doivent être considérées comme des ordres de grandeur.

Alcool méthylique à 99c - 100c	: 2,8 g	dissous dans	100 cm³
Alcool éthylique à 95c	: 0,27	«	»
Alcool butylique normal	: 0,15	«	»
Eau.	: 0,14	«	»
Acétone.	: 0,02	«	»

Ces solubilités dans l'éther, le chloroforme, le benzène, le toluène, sont très faibles (inférieures à un centigramme pour 100 cm³ de solvant). On voit que le prégnandiol glucuronate de sodium est d'autant moins soluble dans les alcools que ceux-ci sont de poids moléculaire plus élevé.

RÉACTIONS COLORÉES DU PRÉGNANDIOLGLUCURONATE DE SODIUM

Il n'existe pas à proprement parler de réaction colorée spécifique.

La copule glucuronique donne après hydrolyse, les réactions de l'acide glucuronique : réactions de réduction dues au groupe pseudo-aldéhydique avec les réactifs usuels des sucres réducteurs : réaction de TOLLENS à la naphtorésorcine et réactions qui en dérivent [131] [132] [43].

Le prégnandiol libéré donnerait évidemment les réactions signalées plus haut.

Nous décrirons plus longuement une application au prégnandiol glucuronate de sodium de la réaction phosphovanillique.

REACTION PHOSPHOVANILLIQUE

Le prégnandiol présente une certaine analogie de structure avec les acides biliaires : noyau identique (prégnane), présence de fonctions alcool secondaire. Ces considérations nous ont amené à essayer sur le prégnandiol la méthode de dosage des sels biliaires de CHABROL, CHARONNAT, COTTET et BLONDE [26].

Cette technique utilise la réaction se produisant grâce au mélange d'un acide fort et d'un aldéhyde aromatique, en l'occurence l'acide phosphorique et la vanilline. Le prégnandiol glucuronate de sodium, soluble dans l'acide phosphorique, donne une coloration rose, quantitative, semblable à la coloration donnée par les acides biliaires.

Le prégnandiol non combiné, insoluble dans ces conditions, ne réagit pas ou faiblement.

Réactifs nécessaires.

Acide phosphorique à 63° BAUME (D = 1,71).

Solution aqueuse de vanilline à 1 pour 100. Cette solution préparée au bain-marie doit être incolore.

Technique.

Le prégnandiol glucuronate de sodium est dissous dans l'acide phosphorique. Quatre centimètres cubes de cette solution sont mesurés dans un tube à essai. Ce tube est porté au bain-marie

bouillant pendant deux minutes, puis refroidi sous un courant d'eau. On ajoute alors 1 cm^3 de la solution de vanilline. On agite par renversement pour assurer le mélange ; cette opération se fait sous un courant d'eau froide pour éviter une élévation de température. La coloration rose se développe aussitôt.

Cinétique de la réaction.

L'intensité de la coloration croît rapidement, pendant la première minute, puis de plus en plus lentement pendant 4 minutes, pour atteindre la stabilité à la 6e minute. La coloration ainsi obtenue demeure stable plus d'une demi-heure. Il est à remarquer que la coloration donnée par les acides biliaires disparaît en ce laps de temps (COTTET, thèse page 44 [32]).

Nous indiquons ci-dessous les valeurs successives obtenues avec 4 cm^3 d'une solution phosphorique de prégnandiolglucuronate de sodium (1mgr. pour 10 cm^3). La coloration a été mesurée en fonction du temps avec l'électrophotomètre de MEUNIER (filtre vert). Les chiffres indiqués correspondent aux divisions du tambour de l'appareil. Ils sont proportionnels à l'intensité de la réaction (voir tableau N° 2).

Tableau N° 2

TEMPS EN MINUTES :	1/2	1	2	3	4	5	6	8	9	10	12	14	16	20	25	30	40
DIVISIONS LUES SUR LE TAMBOUR :	38	45	48	49	49	51	52	52	53	52	52	52	52	53	52	55	55

La réaction est quantitative.

Nous avons à plusieurs reprises vérifié que la coloration croît en fonction linéaire de la concentration.

Nous donnons ici le détail de l'une des expériences démontrant ce fait :

La réaction phosphovanillique est effectuée sur des quantités variables de prégnandiol glucuronate de sodium, obtenues en diluant une solution phosphorique de celui-ci (2 mgr. pour 10 cm^3),

avec de l'acide phosphorique. La lecture des colorations obtenues est effectuée avec l'électrophotomètre de MEUNIER (filtre vert), à la 10e minute. Les valeurs sont réunies dans le tableau N° 3 et le graphique correspondant (fig. 4).

Tableau N° 3

Quantités de prégnandiol glucuronate de Na en réaction.	Volume de solution étalon	Volume de PO^4H^3	Divisions lues sur le photomètre
Témoin	0 cm^3	4 cm^3	17
0,1 mg.	0,5	3,5	24
0,2	1,	3,	32
0,3	1,5	2,5	41
0,4	2,	2,	48
0,6	3,	1,	64
0,8 mg.	4,	0,	80

Remarques.

Les colorations obtenues avec des quantités inférieures à 0,2 mg sont jaunâtres et très faibles, avec des quantités supérieures elles sont franchement roses.

La solution titrée de prégnandiolglucuronate de sodium dans l'acide phosphorique est stable quelques jours : pour des essais effectués avec la solution ci-dessus, 48 heures plus tard, on lit sur le photomètre : avec 0,4 mg : 47, avec 0,8 mg : 80 (Voir tableau N° 3).

Néanmoins, la solution finit par jaunir en vieillissant et l'intensité de la réaction colorée diminue.

Spécificité.

Réaction des sels biliaires, la réaction phosphovanillique n'est évidemment pas spécifique du prégnandiol estérifié. la seule différence appréciable paraissant être une augmentation de la durée de stabilité dans le cas du prégnandiol.

COTTET (thèse [32] page 55), cite de nombreuses substances pouvant interférer en particulier le tryptophane (coloration rose

stable), l'indoxyle (coloration bleue), l'indol et le scatol (rose orangé), sans oublier certaines substances médicamenteuses, éliminables par l'urine, telles que menthol, camphre, saponines, certains polyphénols et certains alcaloïdes.

Nous avons constaté que l'*androstérone* donne une coloration rose indentique à celle fournie par le prégnandiol (rose pour 0,3 mg, jaunâtre pour 0,1 mg).

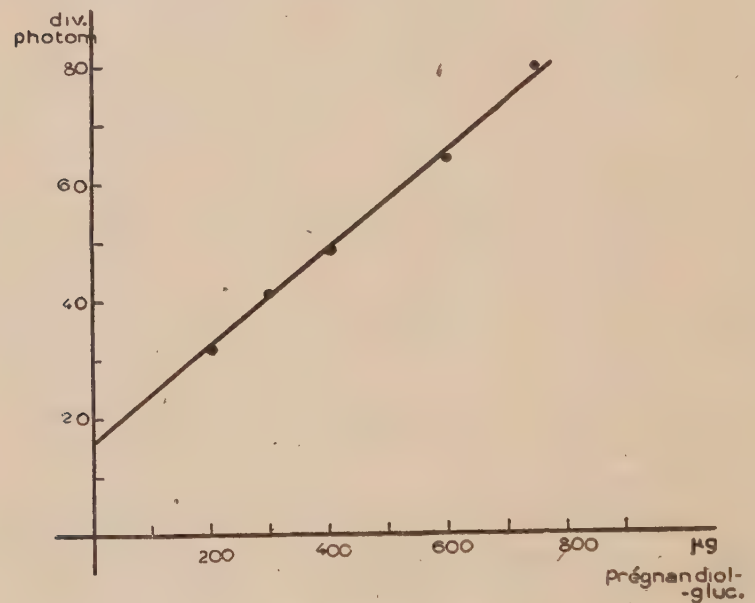


Figure N. 4

Avec l'*œstrone* et l'*œstradiol* une belle coloration jaune fluorescente apparaît au cours du chauffage en milieu phosphorique. L'addition de vanilline ne modifie pas cette coloration. La fluorescence verte est particulièrement nette avec l'œstradiol.

Utilisation possible.

Nous avons comparé le poids du premier précipité fourni par la méthode de dosage de VENNING au chiffre donné par la réaction phosphovanillique effectuée sur ce même précipité, chiffre rapporté à une droite d'étalonnage.

La quantité de prégnandiol dosée ainsi ne représentait dans

un cas que 51 pour 100 du poids total du précipité. Les impuretés auraient donc représenté la moitié environ de ce précipité.

La réaction phosphovanillique pourrait ainsi être utilisée, en lieu et place de la mesure gravimétrique, au terme d'une méthode d'extraction telle que la méthode de VENNING. Cette question n'a pas été poussée plus avant, la spécificité nous paraissant insuffisante.

EXTRACTION ET PURIFICATION DU PREGNANDIOLGLUCURONATE DE NA ET DU PREGNANDIOL LIBRE

La préparation de prégnandiol et de prégnandiolglucuronide suffisamment purs pour pouvoir servir de substances étalon soulève d'assez grandes difficultés et n'a pas été la partie la moins ingrate de notre travail ; car nous avons dû préparer à partir de l'urine, ce dont nous avons eu besoin.

1°) Pour obtenir le prégnandiolglucuronate de sodium, le seul procédé commode d'extraction consiste à appliquer la technique de dosage de VENNING (V. p. 33).

Il nous a été pratiquement impossible pour des raisons de matériel d'opérer sur plus de 4 litres à la fois. D'autre part nous mettions de côté les petites quantités de glucuronide obtenues à chaque dosage. Tous ces échantillons plus ou moins purs sont finalement réunis, il est bon de les reprécipiter dans l'acétone, selon la technique de VENNING, pour se débarrasser de la plus grande partie des impuretés.

Le produit ainsi obtenu est néanmoins encore légèrement souillé. Pour le purifier, nous le dissolvons dans l'alcool à 95 ° et nous le traitons par le charbon activé (acticarbone L.V.S.) à raison d'un gramme pour 100 cm^3 de solution alcoolique. Il est quelquefois nécessaire de renouveler cette opération.

Pour terminer, la solution alcoolique est concentrée par évaporation jusqu'à cristallisation du produit ; les eaux mères contenant les impuretés sont mises à part ; les cristaux obtenus sont, si besoin est, redissous et précipités par évaporation et refroidissement.

2°) Préparation du prégnandiol libre.

On peut utiliser deux procédés :

a) On peut hydrolyser le prégnandiolglucuronide pur obtenu comme il est dit ci-dessus, en solution aqueuse par l'acide chlorhydrique concentré (10 pour 100 d'acide) à ébullition pendant 15 minutes en présence de toluène, agissant comme protecteur du prégnandiol libéré (*). Le prégnandiol libéré est ensuite extrait par l'éther ou le toluène. On procédera si nécessaire à une purification par le charbon activé en solution alcoolique. On terminera par une cristallisation en milieu alcoolique. Le prégnandiol libre cristallise assez bien, beaucoup mieux que le prégnandiolglucuronate de sodium.

b) On peut encore obtenir du prégnandiol en appliquant à des quantités suffisamment importantes d'urines la méthode d'ASTWOOD et JONES (v. p. 69) ou la méthode de BEALL (v. p. 63).

Nous avons cherché en particulier à appliquer la technique de BEALL à des quantités importantes d'urines mais nous n'avons obtenu malheureusement que des rendements faibles et irréguliers (v. p. 56).

(*) Voir page 69.

DEUXIEME PARTIE

DOSAGE DU PREGNANDIOL

DOSAGE DU PREGNANDIOL

Les nombreuses méthodes proposées pour le dosage du prégnandiol peuvent être classées de la manière suivante :

1°) Méthode dosant le prégnandiol sous sa forme conjuguée : le prégnandiolglucuronate de sodium.

Ces méthodes, qui utilisent toutes l'alcool butylique comme moyen d'extraction, se terminent :

a) par une pesée du produit extrait et purifié : méthode de VENNING.

b) indirectement, par le dosage de la copule glucuronique, soit en utilisant la réaction de TOLLENS (méthode de CRISMER-FLORKIN, méthode de JAYLE), soit en utilisant son pouvoir réducteur (méthode d'ALLEN et VIERGIVER).

2°) Méthodes dosant le prégnandiol sous sa forme libre, après hydrolyse. Ces méthodes sont gravimétriques ou colorimétriques :

a) Méthodes se terminant par une pesée de prégnandiol extrait et convenablement purifié : techniques de BEALL, d'ASTWOOD-JONES.

b) Méthodes utilisant une réaction colorée du prégnandiol : première méthode de TALBOT, méthode de GUTERMANN.

La technique que nous proposons se range dans cette catégorie.

c) Méthode dosant le prégnandiol libéré par hydrolyse enzymatique : Méthode de WEIL ; méthode de VEITCH, MILONE, EVERITT, deuxième méthode de TALBOT

CHAPITRE I

METHODE DE VENNING - 1937

La méthode de dosage gravimétrique du prégnandiol urinaire publiée en 1937 par Miss Eleanor VENNING, est la première en date. Malgré ses imperfections, signalées d'ailleurs par l'auteur, elle est encore la plus couramment employée. Elle a permis la presque totalité des travaux sur l'élimination du prégnandiol [134].

C'est à la suite d'une publication d'ODELL et MARRIAN (1936) [109] démontrant la présence dans l'urine de grossesse d'une forme combinée du prégnandiol hydrolysable par les acides que VENNING et BROWNE [136] mettent au point une technique d'extraction par l'alcool butylique (1936).

Ils établissent alors la structure de glucuronide du composé d'ODELL et MARRIAN.

Cette technique précisée devient la méthode quantitative de VENNING (1937) [134].

Ses bases sont :

1°) La solubilité des glucuronides dans les alcools, entre autres dans l'alcool butylique, premier terme de la série suffisamment insoluble dans l'eau.

2°) L'élimination des corps à fonctions phénol et acide par lavage à la soude.

3°) La solubilité du prégnandiol glucuronate de sodium dans l'acétone hydratée chaude et son insolubilité presque totale dans l'acétone plus faiblement hydratée froide.

Il est possible d'obtenir ainsi une substance suffisamment pure et définie pour terminer le dosage par une pesée.

En 1938, Miss VENNING [135] a fourni quelques détails techniques complémentaires.

EXPOSE DE LA TECHNIQUE

MATÉRIEL ET RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

Une grosse ampoule à décantation (2, 3 ou 5 litres).
Une petite ampoule à décantation (125 cm3).
Un ballon (1 litre) pouvant être adapté à un dispositif de distillation sous pression réduite.
Des tubes à centrifuger (60 cm3 si possible).
Une glacière.
Une capsule tarée.
Un siphon d'Ambard.
Fioles d'Erlenmeyer, verres, entonnoirs, etc...
Un bain-marie.
Alcool butylique normal.
Alcool à 95°
Acétone anhydre.
Soude décinormale.

TECHNIQUE

Le dosage s'effectue sur l'urine de 24 heures ou 48 heures (cycle normal) ou sur une fraction aliquote (femme enceinte).

1er temps : L'urine est extraite par agitation avec l'alcool butylique normal dans une grande ampoule à décantation. Cette opération est répétée quatre fois, de façon à employer au total une quantité d'alcool égale au tiers du volume de l'urine. Pour un litre d'urine les volumes successifs d'alcool butylique utilisés seront 200 cm3, 75 cm3, 50 cm3, et 50 cm3.

Les extraits butyliques réunis sont laissés en repos ou centrifugés jusqu'à destruction de l'émulsion tenace qui se forme (*). L'alcool butylique surnageant est décanté dans un ballon. L'urine décantée ou centrifugée est réextraite avec de l'alcool butylique, et celui-ci est réuni au contenu du ballon.

L'agitation avec l'alcool butylique doit être douce (par rotation) pendant une minute pour éviter une trop grande émulsion. S'il y a un dépot, il doit être extrait avec de l'alcool butylique neuf.

(*) COPE [30] opère sur des urines saturées de Chlorure de sodium ce qui facilite beaucoup la séparation des deux phases.

2me temps : L'alcool butylique extractif est distillé sous pression réduite. La température d'ébullition s'établit vers + 40° à + 50°. Le résidu brun restant dans le ballon est repris par 60 cm3 de HO Na 0,10 N. La liqueur colorée obtenue est extraite à nouveau quatre fois par l'alcool butylique (20 cm3, 20 cm3, 10 cm3, 10 cm3) dans une petite ampoule à décantation.

Les extraits butyliques réunis, ainsi obtenus, sont colorés en jaune. On les lave avec deux fois 5 cm3 d'eau : à ce moment, l'alcool est presque incolore ou jaune pâle.

Miss VENNING [135] conseille, avant les deux lavages à l'eau, un lavage avec 3 cm3 de HO Na 0,10 N. qui enlève beaucoup d'impuretés colorées.

L'alcool butylique extractif lavé, centrifugé s'il y a lieu, est évaporé à siccité par distillation sous pression réduite. Le résidu jaunâtre obtenu ne doit plus contenir d'alcool butylique qui gènerait la précipitation ultérieure (il est bon de faire passer un courant d'air sur le résidu pour en chasser les dernières traces).

3me temps. : Ce résidu est repris par 5 cm3 d'eau à une température d'environ 50° , on ajoute un égal volume d'acétone et on chauffe doucement jusqu'à dissolution. La liqueur est transférée dans une fiole d'ERLENMEYER de 125 cm3 ; il vaut mieux alors filtrer. Ceci peut être omis dans les cas de grossesse. Le ballon distillatoire est lavé plusieurs fois avec de l'acétone qui est ajoutée à la liqueur. Le volume est finalement complété à 100 cm3 avec de l'acétone. La précipitation du prégnandiol, insoluble dans ces conditions, commence aussitôt. On laisse en repos une nuit dans un cryostat à — 5°, — 10°.

Un précipité blanc s'est déposé. La plus grande partie du liquide surnageant contenant les impuretés colorées, est décanté, le reste est centrifugé ; on siphone l'acétone avec précaution sans soulever le précipité.

Le précipité repris par quelques gouttes d'eau est porté au bain-marie dans le tube à centrifuger. Le fiole d'ERLENMEYER où s'est effectuée la précipitation est lavée avec de l'alcool à 95° chaud ainsi que le tube à centrifuger contenant le précipité qui se dissout. La solution alcoolique chaude est filtrée à la trompe. Le filtrat recueilli dans une capsule tarée doit être incolore et on peut juger à ce caractère, de la valeur du résultat final.

La capsule est évaporée à siccité dans une étuve (90° - 100°) On termine par une pesée donnant le poids « p » du prégnandiol glucuronate de sodium contenu dans la prise d'essai.

La pureté du précipité sera indiquée par sa coloration ou plutôt son absence de coloration et par le point de fusion.

(P.F. 268° - 271° avec décomposition et dégagement de vapeur)

Seconde précipitation.

Le précipité obtenu comme il est indiqué ci-dessus contient toujours selon les auteurs de 10 à 30 pour cent d'impuretés, en fonction du volume d'urine utilisé, et de la quantité de prégnandiol glucuronate extraite, la quantité d'impuretés augmentant généralement avec la quantité d'urine utilisée.

Une seconde précipitation doit donc être faite, de la manière suivante :

Le premier précipité obtenu dans l'acétone est redissous dans l'eau, reprécipité par addition d'acétone, mis au cryostat, finalement repris par l'alcool et pesé comme ci-dessus.

On emploie 5 cm3 d'eau si le résidu pèse de 15 à 40 mg. (en glucuronate)

On emploie 3 cm3 d'eau s'il est inférieur à 15 mg.

Cette précipitation entraîne une certaine perte de prégnandiol et les auteurs ont été amenés à calculer un facteur de correction, indiqué dans le tableau n° 4, variant en fonction du poids du précipité.

TABLEAU n° 4

Poids du précipité	Quantité d'eau employée	Quantité retrouvée = t
Précipité		
de 2 à 4 mg	3 cm3 d'eau	70 pour 100 de la quantité réelle
5 à 10 »	3 » »	80 » » » »
11 à 15 »	3 » »	85 » » » »
9 à 12 »	5 » »	75 » » » »
13 à 18 »	5 » »	82 » » » »
19 à 25 »	5 » »	85 » » » »
26 à 50 »	5 » »	87 » » » »

Calcul du résultat.

Le résultat est obtenu en prégnandiolglucuronate de sodium (P..M. 536) et sera exprimé en prégnandiol (P.M. 320, voisin du P.M. de la progestérone 315)

Le résultat sera calculé ainsi :

$$\text{Prégnandiol} = \text{« p »} \times t\,\% \times 0{,}597 \qquad \frac{320}{536} = 0{,}597$$

REMARQUES.

1°) Le résultat doit être exprimé par rapport au volume de l'urine des 24 heures, sinon il n'a guère de signification.

2°) Selon l'auteur, le volume d'urine optimum à utiliser doit contenir de 10 à 15 mg. de prégnandiolglucuronate ; chez la femme normale, il faut un volume contenant au moins 4 à 5 mg. (urine de 48 heures).

3°) L'urine doit être recueillie en présence d'un antiseptique et conservée à la glacière : à partir de + 18° il y a hydrolyse même avec un antiseptique à + 4°-+ 7° pas d'hydrolyse en 11 jours. Cette hydrolyse spontanée (*) peut être considérable [141].

Le tricrésol (6 gouttes par volume de 24 heures) est plus actif que le toluène (3 cm3) ou le chloroforme (3 cm3).

0,5 g. pour cent de CN Na prévient l'hydrolyse pendant 4 jours à 20°, mais ne la prévient plus à partir de 26° (VENNING [135]).

Nous avons employé personnellement le cyanure de mercure (1 pour 10.000).

4°) Certaines urines contiennent une substance gommeuse qui complique l'extraction. Elle s'adsorbe fréquemment sur le précipité en lui communiquant une coloration brune. On peut extraire le prégnandiol qui s'y dissimule en dissolvant le résidu brun dans la soude 0,10 N. On extrait par l'alcool butylique et on continue comme d'habitude (VENNING [134]).

(*) L'hydrolyse spontanée du prégnandioglucuronide est due au pouvoir enzymatique de certaines bactéries se développant dans l'urine féminine. BUCHER et GESCHICKTER [15] ont noté que l'hydrolyse n'a pas lieu dans l'urine stérilisée par ébullition ou dans l'urine stérile obtenue par cathétérisme. Le pouvoir enzymatique apparaît dans toutes les urines de femme étudiées ; il n'existe que rarement dans l'urine d'homme ; il peut être transmis d'une urine active à une urine mâle stérile additionnée de prégnandiolglucuronide. On voit que ce phénomène peut amener des erreurs importantes dans les résultats obtenus avec les méthodes dosant le prégnandiolglucuronide (VENNING, CRISMER, JAYLE).

5°) La présence de sang rendrait presque impossible la purification du précipité, même après deux extractions à la soude 0,10 N (VENNING [134]).

DISCUSSION DE LA METHODE DE VENNING

E. H. VENNING [134] estime la méthode valable pour des quantités de prégnandiolglucuronate comprises entre 15 et 40 mg. Pour des quantités inférieures, l'auteur préconise d'employer l'urine de 48 heures ; il décèle ainsi des quantités de l'ordre de 1 à 2 mg. au cours du cycle menstruel.

Cependant, dans ses travaux complémentaires de 1938, Miss VENNING conclut qu'il est impossible de retrouver 1 mg. de prégnandiol glucuronide ajouté à de l'urine n'en contenant pas. 2 mg. sont quelquefois partiellement retrouvés, 3 mg. sont toujours retrouvés avec un rendement de 50 à 67 pour cent. En pratique la méthode ne peut pas déceler moins de 2 mg. [141], [135].

Ces résultats sont réunis dans le tableau suivant (n° 5).

Tableau n° 5

Prégnandiol-glucuronate de Na ajouté	Poids du précipité	Point de fusion	Impuretés pour 100	Prégnandiol-glucuronate retrouvé pour 100
0	0,8	110°	100	
1	0,8	110°	100	
2	2,0	220°	40	60
3	2,8	245°	29	67
5	4,5	252°	18	74

Les urines négatives fournissent un résidu pesant de 0,2 à 1 mg. Dans deux cas, l'auteur a obtenu sur l'urine de 48 heures, de gros résidus ne contenant pas de prégnandiol (44 mg. de P.F. 80°, 20 mg. de P.F. 100°).

Les impuretés dans 60 pour 100 des cas sont négligeables (0,2 à 0,5 mg.), il faut en tenir compte dans 40 pour 100 (1 à 10 mg.).

En conclusion, Miss VENNING considère la méthode comme qualitative plutôt que quantitative en dessous de 5 mg.

Selon WILSON, RANDALL et OSTERBERG [150], les résidus de l'ordre de 0,5 mg. ne contiennent que des quantités négligeables de prégnandiol. C'est aussi l'avis de SIMONNET et BECLERE [123].

Pour HAMBLEN, ASHLEY, BAPTIST [52], l'expérience prouve que 2,3 mg. d'impuretés en moyenne sont extraites d'un litre d'urine.

TRAVAUX PERSONNELS.

Nous avons appliqué la méthode de VENNING à des urines ne contenant pas en principe de prégnandiol. Nous avons obtenu ainsi des extraits pesant 1 ou 2 mg. et quelquefois plus, n'ayant pas les caractéristiques du prégnandiolglucuronate de sodium (voir tableau ci-après).

Ces résultats concordent avec ceux des auteurs précédents. D'autre part, les résidus obtenus à partir d'urines de grossesse contiennent toujours quelques impuretés qui les colorent légèrement.

Résidus obtenus à partir de 1 litre d'urine d'homme (première précipitation) :

1er cas	1,5 mg.	moyenne : 2,2 mg.
2e cas	3,1 mg.	
3e cas	1,7 mg.	
4e cas	2,6 mg.	

Ces chiffres sont à rapprocher des suivants obtenus à partir d'urines de femmes dépourvues d'activité lutéinique (première précipitation).

Femme pendant la phase folliculaire du cycle	1,2 mg. (moyenne)
Femme ménopausée	3 »
Petite fille de trois ans	2,4 »
Femme ovariectomisée	2 »

Conclusion.

Il semble donc que l'on extrait en moyenne 2 mg. d'impuretés d'un litre d'urine et nous ne pouvons qu'adopter la conclusion de Miss VENNING présentant la méthode comme qualitative plutôt que quantitative au dessous de 5 mg.

RENDEMENT.

Le rendement de la méthode augmente avec la quantité de prégnandiol. VENNING [134] expérimentant sur de l'urine dépourvue naturellement de prégnandiol et additionnée de prégnandiol-glucuronate de sodium, en quantité connue, obtient les résultats suivants, après 2 précipitations (tableau n° 6).

Tableau n° 6

Quantité ajoutée	Quantité retrouvée	Rendement pour 100
5 mg.	1 mg.	20
10 mg.	7 mg.	70
20 mg.	17,1 mg.	85
40 mg.	34,8 mg.	87

Nous avons vu ci-dessus que VENNING [135] en 1938 retrouve 74 pour cent des 5 mg. de prégnandiolglucuronate ajouté, mais il semble que ce soit alors après une seule précipitation.

HAMBLEN, ASHLEY, BAPTIST [52] exécutent des expériences analogues (prégnandiolglucuronate dissout dans l'urine n'en contenant pas). Ils retrouvent seulement 54,6 pour 100 de la quantité ajoutée (chiffre moyen), et décident d'appliquer un facteur de correction.

STOVER et PRATT [126] ajoutent 15 mg. de prégnandiol-

glucuronate à 1.000 cm3 d'urine n'en contenant pas. Ils retrouvent 12,4 mg., soit 82,7 pour cent.

Les travaux de COPE [30] fournissent des rendements légèrement inférieurs à ceux de VENNING.

TRAVAUX PERSONNELS.

Une même urine, masculine, est divisée en deux parties égales (500 cm3 chaque).

12,5 mg. de prégnandiolglucuronate de sodium sont dissous dans une des fractions ; les deux sont traitées selon la méthode de VENNING dans des conditions aussi semblables que possible.

1°) L'urine sans prégnandiol donne un résidu de 3,1 mg. (première précipitation).

2°) L'urine contenant du prégnandiol, un résidu de 11 mg. (première précipitation, résidu souillé).

Si l'on admet que les 3,1 mg. extraits dans la première fraction sont constitués par des impuretés et qu'ils doivent se retrouver dans la deuxième fraction, on peut considérer qu'il y a 11 — 3,1 = 7,9 mg. de prégnandiolglucuronate extrait, soit un rendement de 64 pour cent.

Une autre expérience réalisée dans les mêmes conditions avec 14 mg. de prégnandiolglucuronate a donné un rendement de 61 pour cent.

FIDÉLITÉ DES RÉSULTATS.

Une urine donnée est séparée en plusieurs fractions ; le dosage du prégnandiol suivant la technique de VENNING est effectué sur chaque fraction dans des conditions aussi semblables que possible. Nous avons pu vérifier ainsi la valeur relative et la constance des résultats sur une même urine (voir tableau n° 7).

Tableau n° 7

					Moyenne	Ecart maximum avec la moyenne %
Cas N° 1 Urine de femme enceinte de 3 mois 4 fractions de 1 litre	7,6	7,7	8,4	7,2	7,7	10
Cas N° 2 Femme enceinte de 4 mois. 3 fractions de 1 litre	17,2	16,6	14,8		16,2	8,6
Cas N° 3 Femme cycle normal phase lutéinique. 2 fractions de 1 litre	2,1	2,0			2,05	2,5
Cas N° 4 Femme enceinte de 4 mois. 3 fractions de 1 litre	18,2	22,4	23,5		21,3	14
Cas N° 5 Femmes enceintes (mélange d'urines) 2 fractions de 1 litre	32	29			30,5	4,9
Cas N° 6 Femmes enceintes (mélange) 2 fractions de 1 litre	26	32			29	10
Cas N° 7 Urine masculine 2 fractions de 1 litre	1,5	1,52			1,51	0,66
Cas N° 8 Urine masculine 2 fractions de 1 litre	3,1	3.2			3,15	1,5

REMARQUE :

Les résultats sont exprimés en prégnandiol sauf pour les cas n° 7 et n° 8, où ils représentent le poids du résidu provenant de l'application de la méthode de VENNING à l'urine masculine.

L'erreur relative moyenne pour ces 8 expériences est de 6,7 pour cent.

On peut considérer en conséquence que la méthode de VENNING donne des résultats comparables à 7 pour cent près environ, ce qui représente une assez bonne approximation pour une méthode comportant autant d'opérations.

CRITIQUE DE QUELQUES POINTS

EXTRACTION BUTYLIQUE

L'extraction du prégnandiolglucuronate de sodium de l'urine par l'alcool butylique n'est pas parfaite ; c'est du moins la conclusion de deux expériences conduites de la manière suivante :

Du prégnandiolglucuronate de sodium est dissous dans 500 cm3 d'eau (47 mg. dans la première expérience, 49 mg. dans la seconde). La solution aqueuse ainsi obtenue est extraite par l'alcool butylique de la manière indiquée par Miss VENNING : 4 agitations dans une ampoule à décantation, la première avec 100 cm3 d'alcool butylique, la deuxième avec 40 cm3, la troisième et la quatrième avec 23 cm3. Chaque extrait butylique est évaporé séparément.

Les deux expériences nous ont donné des résultats presque identiques dont voici les moyennes :

1re extraction : 40 pour cent du prégnandiolglucuronate dissous sont extraits.
2e extraction : 20 pour cent » »
3e extraction : 10 pour cent » »
4e extraction : 5 pour cent » »

La quantité totale extraite ne dépasse pas 75 pour cent (74,4 dans un cas, 75,2 dans l'autre).

Il ne faut pas oublier que l'alcool butylique se dissout en assez grande proportion dans l'eau, ce qui peut expliquer ce coefficient de partage.

2e PRÉCIPITATION

Doit-on faire une 2e précipitation dans l'acétone ? La question sera résolue en fonction de l'aspect du précipité :

S'il s'agit d'un précipité abondant et coloré, la seconde précipitation s'impose.

Si le précipité est pur (incolore), elle n'est guère utile.

Le problème est délicat dans le cas des urines pauvres en prégnandiol, telles que celles recueillies au cours du cycle menstruel. Les précipités obtenus dans ce cas contiennent une proportion relativement forte d'impuretés : 1 à 2 mg. pour 1 litre environ (voir ci-dessus) pour un résidu de l'ordre de 3 à 5 mg.

Il semble donc qu'une seconde précipitation s'impose ; malheureusement la redissolution d'une si petite quantité de prégnandiol dans l'eau et l'acétone, puis sa précipitation, ne s'effectuent pas sans perte, une partie du prégnandiolglucuronate de sodium étant utilisée à saturer les 100 cm3 d'acétone.

Miss VENNING estime la perte à 30 pour cent et corrige son résultat d'autant. Ce facteur de correction est important et fatalement inconstant ; aussi vaut-il mieux considérer les résultats inférieurs à 5 ou 6 mg. comme plus relatifs qu'absolus, les valeurs élevées étant plus exactes que les valeurs faibles.

Selon COPE [30], la seconde précipitation fournit un rendement irrégulier qui atteint dans les meilleures conditions 85 pour cent ; il est parfois très mauvais. Cet auteur estime qu'il est téméraire d'appeler prégnandiol le premier précipité, bien que le point de fusion du second ne soit pas forcément plus élevé que celui du premier.

SPÉCIFICITÉ — POINT DE FUSION.

La spécificité de la méthode est assurée par la prise du point de fusion du résidu final.

Il est bon de remarquer que cette opération ne présente aucune difficulté dans le cas des urines de femme enceinte, mais qu'il n'en est pas de même avec les faibles résidus vernissés obtenus au cours du cycle menstruel ; d'autant plus que la fusion n'est pas franche. Elle s'effectue, selon l'auteur, « avec décomposition et dégagement de vapeur ». Il y a plutôt carbonisation que fusion du fait de la

copule glucuronique. Le prégnandiol non estérifié présente au contraire une fusion parfaitement nette.

Miss VENNING [134] en 1937, indique comme point de fusion du prégnandiolglucuronate de soude, la zone + 268°-+ 271°. Elle précise en 1938 qu'entre 260° et 271° il y a de 0 à 10 pour cent d'impuretés et que le produit doit fondre ou se décomposer à une température inférieure à 280°. Dans le cas contraire, ce n'en serait généralement pas.

Cependant nous avons trouvé dans un grand nombre de cas, des valeurs voisines ou supérieures : nous avons en particulier obtenu par cristallisation dans l'alcool et purification sur du charbon activé un produit incolore fondant avec dégagement de vapeur à + 292°-+ 293° au bloc Maquenne (urine de femme enceinte).

M. JAYLE en publiant en 1943 sa méthode de dosage [72] signale le même fait. Il a obtenu par cristallisation fractionnée dans des solutions hydroacétoniques un produit cristallisé en tables hexagonales, de point de fusion + 292°-+293° (*).

Nous avons observé nous-même des points de fusion du même ordre (290°).

Le produit fourni par la méthode de VENNING paraît donc mal défini. Selon JAYLE [72], il contiendrait à côté du prégnandiol normal, plusieurs isomères : le prégnandiol $\alpha\ \alpha$, l'alloprégnandiol $\alpha\ \alpha$, et l'alloprégnandiol 3 β 20 α sans compter les produits d'hydrogénation partielle de la progestérone, de la désoxycorticostérone, tous ces corps s'éliminant sous forme de glucuronides.

COPE [30] présente des observations analogues.

Il est évident que tous les corps extraits par MARKER et ses collaborateurs (voir p. 6 et 7) à partir d'importants volumes d'urines

(*) JAYLE [72] dissout dans 6 cm3 d'acétone à 50 pour cent, 40 mg. environ de prégnandiolglucuronide brut. L'addition à cette solution de 20 cm3 d'acétone provoque l'apparition d'un précité « A » (P.F. 295° à 300°). On le fait cristalliser une deuxième fois dans l'acétone (P.F. 291° à 292°, 92 pour cent de prégnandiolglucuronide selon le dosage colorimétrique). Il faut additionner les eaux mères de plus de 40 cm3 d'acétone pour obtenir l'apparition d'un nouveau trouble. Celui-ci, après séjour de 24 heures à la glacière, fournit un précipité jaunâtre « B ». Ce deuxième précipité après recristallisation ne contient que 75 pour cent de prégnandiolglucuronide et présente un point de fusion voisin de 272°.

de femmes enceintes doivent se rencontrer en proportion variable dans l'extrait butylique.

D'autre part, HECHTER [62] dosant le pouvoir réducteur du résidu de VENNING (voir note page 41) obtient ainsi des valeurs très comparables aux résultats gravimétriques pour les femmes normales (moins de 8 pour 100 d'écart), inconciliables par contre pour certains cas anormaux (jusqu'à 100 pour 100 d'écart).

MODIFICATIONS APPORTEES A LA METHODE DE VENNING

Quelques auteurs ont apporté des modifications légères à la technique décrite ci-dessus. Ces modifications ne portent que sur des points de détail et ne changent rien à la ligne générale de la méthode.

C'est ainsi que BANCIU [7] diminue la quantité de l'eau employée au cours de la précipitation (3 cm3 au lieu de 5).

ROBEY (thèse p. 47 [117]) substitue la centrifugation à la filtration après la précipitation acétonique : la solution hydroacétonique est introduite dans un tube à centrifuger. Ce tube est refroidi avec le pot métallique qui l'entoure dans une saumure à — 10° pendant une heure, puis on centrifuge rapidement pour éviter le réchauffement, toute élévation de température entraînant une redissolution du précipité. On décante ensuite l'acétone.

Le résidu repris par l'eau et l'alcool à 95° est centrifugé. La solution alcoolique contenant le prégnandiolglucuronate de sodium est évaporée sous vide en présence d'anhydride phosphorique ou de chlorure de calcium dans un cristallisoir taré ; une deuxième précipitation acétonique est réalisée dans les mêmes conditions s'il est nécessaire.

KNOPPERS [78] purifie le premier extrait butylique par agitation avec du noir Norit (1,25 g. pour 100 cm3). Le filtrat incolore est ensuite traité comme dans la méthode de VENNING.

Cette opération donne un produit final plus pur.

Le rendement de la technique ainsi modifiée est de 65 pour 100, inférieur, selon l'auteur, à celui du procédé ordinaire.

MODIFICATIONS PERSONNELLES.

L'expérience nous a conduit à modifier légèrement la technique initiale de VENNING dans le sens indiqué par BANCIU et ROBEY. Le produit d'évaporation du 2e extrait butylique est repris par 2,5 cm3 d'eau et 50 cm3 d'acétone tiède ; la solution ainsi obtenue est rassemblée dans un ou deux tubes à centrifuger (*). Ces tubes sont bouchés et plongés dans un mélange réfrigérant (glace + sel), conservé à la glacière, permettant d'obtenir une température de — 10° pendant 5 ou 6 heures. Au bout de ce temps ils sont centrifugés très rapidement et décantés avec un siphon d'Ambard. Les transvasements sont réduits ainsi au minimum. Aussi vite que l'on opère, la solution mère se réchauffe toujours au cours de la centrifugation et il y a peut-être là une cause d'erreur.

(*) En fait nous répartissons la solution acétonique dans deux tubes à centrifuger, la centrifugeuse utilisée ne permettant pas l'emploi de tubes suffisamment grands.

CHAPITRE II

METHODE DOSANT L'ACIDE GLUCURONIQUE LIBERE PAR L'HYDROLYSE DU PREGNANDIOL - GLUCURONIDE

La méthode de CRISMER [33] et la méthode de JAYLE [72] extraient le prégnandiol glucuronate de sodium, hydrolysent le complexe et se terminent par un dosage colorimétrique de l'acide glucuronique libéré. Les procédés d'extraction employés par chacune de ces méthodes diffèrent, mais l'une comme l'autre dosent l'acide glucuronique libéré au moyen de la réaction colorée de TOLLENS [131, 132] suivant la technique indiquée par FLORKIN [43]. Dans cette réaction, l'acide glucuronique, en présence de naphtorésorcine et de Cl H, développe, après chauffage au bain-marie, une coloration bleue, quantitative, soluble dans l'éther.

ALLEN et VIERGIVER [3] dosent également l'acide glucuronique libéré par l'hydrolyse du prégnandiol glucuronide. Celui-ci est isolé à l'état de sel de plomb à partir d'un extrait butylique. L'acide glucuronique libéré par l'hydrolyse est dosé grâce à son pouvoir réducteur (*).

(*) HECHTER [62] en 1942 a essayé de contrôler les résultats par la méthode de VENNING en hydrolysant par SO4 H2 le résidu pesé et en dosant par la méthode de FOLIN et WU le pouvoir réducteur de l'acide glucuronique libéré.

MÉTHODE DE CRISMER ET FLORKIN [33] [44]

Roger CRISMER applique au dosage du prégnandiolucuronate de sodium la technique générale de dosage des glucuro-conjugués de Marcel FLORKIN et Roger CRISMER [43, 44].

Cette technique est caractérisée par les principaux points suivants :

1°) Déglucidation de l'urine par le sulfate de cuivre en milieu alcalin ; cette opération précipite hexoses, pentoses et acide glucuronique libre, mais ne précipite pas les acides glucuroniques conjugués.

2°) Défécation par l'acétate mercurique enlevant entre autre l'indoxyle qui, au cours du chauffage en milieu acide, donnerait de l'indirubine. Les ions cuivriques et mercuriques en excès sont éliminés par l'acide sulfhydrique.

3°) Dosage de l'acide glucuronique conjugué par la réaction de TOLLENS selon une technique inspirée de celle de MAUGHAN, EVELYN et BROWNE [106].

R. CRISMER a rendu cette méthode applicable au dosage du prégnandiol en intercalant après la déglucidation et la défécation de l'urine une extraction à l'alcool butylique et un lavage à la soude.

EXPOSE DE LA TECHNIQUE

RÉACTIFS ET MATÉRIEL NÉCESSAIRE.

Solution de sulfate de cuivre à 20 pour cent.
Solution d'hydroxyde calcique à 10 pour cent.
Solution d'acétate mercurique à 25 pour cent.
Alcool butylique pur.
Soude décinormale.
Acide chlorhydrique (D = 1,19)
Solution de naphtorésorcine à 0,2 pour cent : 0,2 g. de naphtorésorcine dans 100 cm³ d'eau distillée mis 24 heures à 38° et conservé 3 jours au maximum à la glacière.
Solution de glucurone (18,14 mg. pour 100 dans l'eau, soit 20 mg. d'acide glucuronique pour 100.
Ether exempt de peroxydes.
Appareil à production de gaz sulfhydrique.

Filtre serré (Schleicher et Schüll 602 cl).
Appareil à distillation sous vide.
Photomètre de PULFRICH.

TECHNIQUE.

Dans un ballon de 100 cm3, on verse 40 cm3 d'urine filtrée auxquels on ajoute 20 cm3 de sulfate cuivrique à 20 pour cent, puis 20 cm3 d'une suspension d'hydroxyde calcique à 10 pour cent. Après avoir ajouté de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge, on attend une demi-heure en mélangeant fréquemment. Après centrifugation, on mesure 70 cm3 du filtrat auxquels on ajoute 1/5 du volume, soit 14 cm3 d'acétate mercurique à 25 pour cent.

On sépare le précipité par centrifugation et on traite le filtrat par un courant gazeux d'hydrogène sulfuré. On sépare le précipité de sulfure sur un filtre serré, puis on élimine du filtrat l'hydrogène sulfuré en y faisant barbotter un courant d'air pendant quelques minutes. Soixante centimètres cubes de ce filtrat sont alors versés dans un grand tube à centrifugation, et additionnés de 15 cm3 d'alcool butylique.

Les deux liquides sont mélangés avec un agitateur, puis séparés par centrifugation. L'alcool butylique surnageant est décanté. Cette extraction est répétée trois fois encore avec 15 cm3 d'alcool butylique à chaque fois. Au cours de cette opération, il ne se forme pas cette émulsion « si gênante quand on suit la technique de VENNING, le traitement préalable de l'urine facilitant beaucoup l'extraction butylique » . Les 60 cm3 d'alcool butylique provenant de l'extraction sont réunis dans un ballon à fond rond à tubulure latérale. Ce ballon est adapté à un autre ballon du même type. On constitue ainsi un appareil à distillation dans le vide qui adapté à une bonne trompe à eau, permet d'évaporer l'alcool butylique à une température oscillant entre 30° et 45° (*)

On obtient un résidu amorphe et blanchâtre que l'on extrait trois fois de suite avec deux centimètres cubes de soude 0,10 N. On chauffe légèrement au bain-marie pour faciliter cette extraction. Les extraits alcalins successifs sont réunis dans un ballon jaugé de 10 centimètres cubes. On ajoute quelques gouttes de soude pour atteindre le trait de jauge. Le liquide obtenu est limpide et légèrement jaunâtre. On effectue le dosage de l'acide glucuronique selon la méthode de FLORKIN et CRISMER sur 2 cm3.

(*) Un système quelconque de distillation dans le vide donnera des résultats équivalents.

Dosage de l'acide glucuronique.

Dans un tube de verre Pyrex de 20 cm de long sur 2 cm de diamètre bouchant à l'émeri, on met 2 cm3 de la solution alcaline préparée ci-dessus, puis 2 cm3 d'acide chlorhydrique (D = 1,19) dilué par addition d'un égal volume d'eau puis 2 cm3 de solution de naphtorésorcime à 0,2 pour cent. Le tube est abandonné au bain-marie une demi-heure puis laissé dix minutes dans la glace fondante. On ajoute alors 2 cm3 d'alcool éthylique à 94c puis 15 cm3 d'éther purifié. Le tube est bouché et secoué vigoureusement pendant une demi-minute pour extraire la coloration. L'éther décanté, coloré en lilas, est examiné au photomètre.

Pour chaque échantillon d'urine à analyser on prépare une solution de comparaison. C'est la même urine ayant subi au préalable une hydrolyse en milieu acide. Pour cela à 40 cm3 d'urine versés dans un ballon jaugé de 100 cm3, on ajoute 10 cm3 de ClH (D = 1,19) dilué deux fois ; on porte au bain-marie bouillant pendant une demi-heure. Après neutralisation de l'acide par une quantité correspondante d'hydroxyde sodique concentré, on traite cette urine point par point comme l'échantillon à doser. Tous les glucuro-conjugués de l'urine sont ainsi hydrolysés et l'acide glucuronique libéré sera éliminé lors de la déglucidation par le sulfate cuivrique.

Pour chaque série de détermination, il faut établir la position de la droite d'étalonnage du photomètre employé, variable d'une expérience à l'autre. Pour cela, on fait la réaction de TOLLENS sur une solution pure d'acide glucuronique ou de glucurone de concentration connue et on fait la mesure photométrique en utilisant comme solution de comparaison un mélange de 2 cm3 d'eau distillée, de 2 cm3 d'acide chlorhydrique et de 2 cm3 de solution de naphtorésorcine.

Pour les mesures au moyen du photomètre de PULFRICH qui se font avec le filtre SS 7 on transfère au moyen d'une pipette les extraits éthérés dans des cuvettes de 30 mm d'épaisseur. (CRISMER [33])

MÉTHODES DE M.F. JAYLE 1943 et 1945 [72] [73]

M. F. JAYLE a publié en 1943 avec O. CREPY et P. WOLF une technique de dosage du prégnandiol par détermination de l'acide glucuronique combiné. Ils utilisent à cet effet comme FLORKIN et CRISMER la réaction de TOLLENS. Cette méthode est surtout applicable aux urines de grossesse. Tout récemment (1945), M. F. JAYLE et O. LIBERT ont présenté une adaptation au cycle menstruel et au début de la gestation. Cette dernière technique a permis une étude très intéressante de ces périodes (voir page 124).

Nous décrirons successivement ces deux techniques.

TECHNIQUE DE 1943 UTILISANT LA PRECIPITATION ACETONIQUE

La technique d'extraction est inspirée de la méthode de VENNING, mais les deux séries de quatre extractions butyliques sont remplacées par une extraction unique. Celle-ci est faite à pH 10, les auteurs ayant observé qu'il y avait d'autant moins de pigments entraînés que le pH était plus élevé. La première extraction d'autre part entrainant 80 pour cent du prégnandiol glucuronide, les trois autres sont supprimées ; un coefficient appliqué à la fin du dosage permet de tenir compte du déficit de 20 pour cent ainsi créé. La purification peut être réduite à un lavage à la soude et deux à l'eau. La cristallisation acétonique est aussi quelque peu modifiée (diminution des quantités respectives d'eau et d'acétone).

C'est au produit de cette cristallisation qu'on applique la réaction de TOLLENS [132] selon la technique de FLORKIN et CRISMER [43].

EXPOSE DE LA TECHNIQUE [72]

MATÉRIEL ET RÉACTIFS NÉCESSAIRES.

1. - Extractions et décantations : ampoules à décantation cylindrique de 6 cm. de diamètre et 50 cm. de longueur.

Tapis roulant.

2. - Evaporation à sec : appareil à distillation sous vide à rodages normalisés comprenant trois ballons montés en série sur un réfrigérant unique de 60 cm. de longueur chauffé par une plaque chauffante bien calorifugée.

3. - Précipitation dans l'acétone et passage dans l'alcool méthylique : tubes à centrifuger de 60 cm^3 de capacité.

Fioles jaugées de 10, 20 ou 25 cm^3 selon les cas.

4. - Réaction de TOLLENS : tubes à essais bouchés émeri : trois tubes par dosage plus quatre tubes pour la solution étalon.

Electrophotomètre de MEUNIER.

Cuve « Rufisque » de 1 cm. d'épaisseur et 8 cm^3 de capacité.

Réactifs :

Alcool butylique pur.

Solution de soude à 10 %.

Soude 0,10 N et 0,3 N.

Eau distillée.

Acétone pure.

Alcool méthylique pur.

Acide chlorhydrique à 50 %.

Réactif de TOLLENS : 0,2 g. naphtorésorcine dans 100 cm3 d'eau distillée, mis vingt-quatre heures à 38° et conservé trois jours au maximum à la glacière.

Glucurone HOFFMANN LAROCHE : 18, 14 mg. pour cent dans l'eau, soit 20 mg. d'acide glucuronique pour cent.

Ether exempt de peroxydes (distillé fraichement sur chlorure stanneux).

TECHNIQUE.

Urines de vingt-quatre heures recueillies sur 0,1 g. de cyanure mercurique. 250 cm3 d'urine de femme enceinte par dosage sont alcalinisés à pH 10 par de la soude à 10 % ; vérification du pH par les indicateurs colorés ou par l'électrode de verre. Les urines sont versées dans les ampoules à décantation cylindrique et additionnées de 150 cm3 d'alcool butylique. Ces tubes sont placés sur un tapis roulant (modèle de RAOUL-MEUNIER) qui les fait tourner sur eux-mêmes pendant un temps suffisant pour que l'équilibre de partage entre les phases soit atteint, soit une demi-heure. On relève les tubes avec précaution pour éviter les émulsions, on laisse décanter quelques minutes et on sépare l'urine de l'extrait butylique.

LAVAGE DES EXTRAITS BUTYLIQUES. — On ajoute à l'alcool butylique 75 cm3 de soude 0,3 N et on replace les tubes sur le tapis roulant pendant une demi heure. On lave ensuite de la même manière avec deux fois 20 cm3 d'eau. On laisse décanter jusqu'à clarification complète. La phase aqueuse est soutirée, la phase butylique ensuite, et l'ampoule lavée avec quelques centimètres cubes d'alcool butylique. Les eaux de lavage sont extraites par 50 cm3 d'alcool butylique ; les extraits butyliques réunis sont évaporés à sec.

EVAPORATION A SEC. — Les ballons sont adaptés à l'appareil de distillation sous vide et évaporés à sec. Opération qui ne doit pas durer plus d'une heure et demie. Quand il ne reste plus que des traces d'alcool (qui gêneraient la formation du précipité dans l'acétone), l'entrée d'air est ouverte afin de les entraîner rapidement comme le démontre la pratique.

PRECIPITATION DANS L'ACETONE. — Dans chaque tube on verse 1 cm3 d'eau et 3 cm3 d'acétone, on chauffe jusqu'à dissolution totale du précipité. La solution est versée dans un tube à centrifugation de 60 cm3. Le ballon est rincé à chaud une première fois avec 0,5 cm3 d'eau et 3 cm3 d'acétone. On complète à 50 cm3 dans le tube à centrifuger en versant l'acétone par petites quantités.

Ces tubes sont placés à - 5° jusqu'au lendemain.

PASSAGE DANS L'ALCOOL METHYLIQUE. — Les tubes sont centrifugés. Le précipité est traité par de l'alcool méthylique chaud et entraîné dans des fioles jaugées de 10 à 20 cm3. Les phosphates peu solubles se déposent par refroidissement. On décante et on prend des parties aliquotes de la solution pour le dosage de l'acide glucuronique selon la méthode de FLORKIN et CRISMER.

DOSAGE DE L'ACIDE GLUCURONIQUE. - TECHNIQUE DE FLORKIN ET CRISMER. — Dans un premier temps on introduit dans trois tubes à essais, bouchés à l'émeri, de 25 cm3, respectivement 0,2 ; 0,5 ; 1 cm3 de la solution méthylique à doser afin de déterminer les volumes correspondant à des quantités d'acide glucuronique comprises entre 0,05 mg. et 0,25 mg. - Dans un deuxième temps, on recommence le dosage si besoin est, afin de se placer dans cette zone de concentration. L'alcool est soigneusement évaporé à sec (toute trace d'alcool précipiterait le colorant). On prépare concurremment quatre tubes pour l'étalonnage comprenant respectivement 0.25 ; 5 ; 1 et 1,5 cm3 de la solution de glucurone et on complète à 2 cm3 .Il est nécessaire de refaire un étalonnage pour chaque série de dosages car le réactif de TOLLENS est assez variable.

On introduit alors dans chaque tubes 2 cm3 de Cl H à 50 % et 2 cm3 de réactif de TOLLENS. On bouche les tubes. On les plonge dans un bain-marie à 100° pendant une demi-heure. On ajoute ensuite à chacun d'eux 15 cm3 d'éther exempt de peroxyde. On agite vigoureusement pendant trente secondes. Le colorant passe entièrement dans la couche éthérée. Il ne reste plus qu'à faire la mesure colorimétrique.

MESURE COLORIMETRIQUE. — Filtre vert. Diaphragme 5. Cuve « Rufisque ». La solution éthérée est placée dans la cuve et la mesure prise aussitôt. La coloration est stable pendant quelques minutes mais l'éther s'évapore assez vite dans la cuve sous l'action de la chaleur dégagée par la lampe de l'appareil.

Calcul des résultats.

On établit la droite d'étalonnage qui permettra de déterminer pour chaque tube le nombre de mg. d'acide glucuronique correspondant au nombre de divisions du tambour de l'électrophotomètre. Connaissant la quantité d'acide glucuronique pour la prise d'essai, on en déduit la quantité correspondante au volume total d'alcool méthylique utilisé, c'est-à-dire au volume d'urine traitée. On rapporte ensuite au volume de vingt-quatre heures.

Pour obtenir le taux du prégnandiol glucuronide, il suffira de multiplier le chiffre trouvé par le rapport des poids moléculaires du prégnandiol glucuronide et de l'acide glucuronique, soit $\frac{536}{194} = 2{,}762$

En clinique, il est d'usage de traduire les résultats en prégnandiol

en remplaçant le coefficient précédent par $\frac{320}{194} = 1{,}64$

Ce résultat sera multiplié par 1,18 afin de tenir compte du déficit causé par l'extraction butylique unique.

TECHNIQUE DE 1945
(M. F. JAYLE ET O. LIBERT [73]

Il s'agit plus exactement de deux techniques nouvelles.

L'une appelée par les auteurs « dosage direct » constitue une simplification de la méthode décrite ci-dessus. Plus sensible, elle est moins spécifique et évalue « la totalité des stéroides glucuronides non phénoliques ». Elle donne ainsi des valeurs plus élevées.

L'autre, au contraire, est plus quantitative que la méthode par précipitation acétonique. Celle-ci est remplacée par une précipitation dans l'éther du prégnandiol glucuronide en solution méthylique.

« On part de 500 cm3 d'urine amenée préalablement à pH 10 et on extrait successivement par 200 cm3 d'alcool butylique pendant 45 minutes, ensuite par 75 cm3 pendant 15 minutes, et enfin par 50 cm3 pendant 15 minutes. L'opération est conduite dans une ampoule à décantation cylindrique fermée d'un côté et munie de l'autre d'un robinet. Il est essentiel de réaliser l'extraction sur les courroies sans fin et à tension réglable d'un tapis roulant, ce qui permet d'éviter des émulsions. »

Le résidu laissé par l'extrait ainsi obtenu, évaporé, pourra être traité de deux façons différentes.

a) Dosage direct.

« Le résidu d'extraction est dissous directement dans 5 cm3 d'alcool méthylique ou dans 10 cm3 de ce même solvant au cours de la phase lutéale du cycle. On fait directement la réaction de TOLLENS sur 0,6 cm3, 0,8 cm3 et 1 cm3 de ces extraits bruts. Les résultats sont traduits en milligrammes de prégnandiol par 24 heures sous la dénomination « dosage direct ».

b) Précipitation éthérée.

Le résidu butylique peut être repris par trois fois 1 cm3 d'alcool méthylique qu'on introduit dans un Erlenmeyer en prenant

garde de ne pas en perdre. On ajoute alors 27 cm3 d'éther et il se produit un précipité qu'on laisse reposer à la glacière pendant quelques heures. On centrifuge, et le culot est repris par 5 ou 10 cm3 d'alcool méthylique. On prend des parties aliquotes pour effectuer la réaction de TOLLENS-FLORKIN.

Les auteurs ont constaté que, quand l'alcool méthylique et l'éther sont dans le rapport de 1/10e, la précipitation est totale. « Ce procédé est plus quantitatif que la précipitation acétonique, surtout pour le prégnandiol urinaire qui se comporte différemment du prégnandiol glucuronique cristallisé car il se trouve lié vraisemblablement à un polypeptide non ultrafiltrable. La cristallisation acétonique dissocie partiellement ce complexe alors que l'éther le précipite complètement. »

CRITIQUE DES METHODES DOSANT L'ACIDE GLUCURONIQUE PAR CALORIMETRIE

1°) LE DOSAGE DES GLUCURONIDES PAR LA METHODE DE FLORKIN.

Nous avons dit plus haut que les méthodes de dosage du prégnandiol de CRISMER et de JAYLE se terminaient par un dosage d'acide glucuronique selon la technique de FLORKIN et CRISMER. Cette dernière est une application à l'urine de la méthode de MAUGHAN, EVELYN et BROWNE [106] (1938).

Ces auteurs, reprenant la méthode quantitative de TOLLENS [132] qui date de 1908, augmentent la sensibilité en employant la naphtorésorcine en solution aqueuse, au lieu d'une solution alcoolique ; ils définissent les conditions de préparation de ce réactif et son emploi (*). MAUGHAN et ses collaborateurs ont appliqué cette technique au dosage des glucuronides conjugués dans l'urine. Ils obtiennent des résultats satisfaisants en utilisant pour la

---

(*) TECHNIQUE DE MAUGHAN, EVELYN, BROWNE : [106] — On mélange dans un tube 2 cm3 de la solution glucuronique à doser, 2 cm3 de la solution de naphtorésorcine à 2 %, 2 cm3 de ClH concentré. Le tube est chauffé au B.M. bouillant 30 min., puis placé dans un bain de glace 5 à 10 min. La coloration obtenue est extraite par 2 cm3 d'alcool à 90° et 15 cm3 d'éther débarrassé des peroxydes. On agite 20 à 30 secondes. La solution éthérée est ensuite passée au colorimètre.

mesure colorométrique un filtre transmettant la bande des 565 μ. Dans ces conditions la couleur brune qui se développe dans l'urine cause peu de gêne. L'erreur moyenne par rapport à l'acide glucuronique total éliminé dans l'urine par 24 heures, serait de 6 pour cent.

MAUGHAN, EVELYN et J. S. L. BROWNE ont, en particulier, essayé leur méthode sur de l'urine additionnée de prégnandiol-glucuronide de sodium et qui, auparavant, n'en contenait pas. Ils ont retrouvé avec beaucoup d'exactitude l'acide glucuronique correspondant (erreur ne dépassant pas 1,15 pour 100).

Il en fut de même pour l'acide glucuronique de l'oestriol-glucuronide.

L'originalité de la méthode FLORKIN et CRISMER est d'avoir fait précéder la technique de MAUGHAN, EVELYN et BROWNE par un ensemble de purifications la rendant spécifique des glucuronides conjugués. En effet, par la déglucidation au sulfate de cuivre, FLORKIN se débarrasse des hexoses et des pentoses qui peuvent être présents dans l'urine et surtout de l'acide glucuronique libre. Grâce à la défécation à l'acétate mercurique il élimine l'indoxyle. Celui-ci au cours du chauffage en milieu acide donne de l'indirubine qui participe à cette couleur brune gênant la mesure colorimétrique dans la technique de MAUGHAN.

En fait, seul CRISMER utilise dans son dosage du prégnandiol la technique de FLORKIN et CRISMER ; car JAYLE, CREPY et WOLFF qui suivent au début un procédé d'extraction dérivé de celui de Miss VENNING terminent par la réaction colorée de TOLLENS telle qu'elle a été définie par MAUGHAN.

2°) LA MÉTHODE DE DOSAGE DU PRÉGNANDIOL DE ROGER CRISMER.

Cette méthode (voir page 48), associe à la technique de dosage des glucuro-conjugués de FLORKIN et CRISMER une extraction par l'alcool butylique. Elle semble donc devoir être assez spécifique et selon l'auteur seul l'oestriolglucuronide pourrait interférer.

D'autre part, étant donné la sensibilité de la méthode colorimétrique, elle permet d'opérer sur des quantités d'urines fort infé-

rieures à celles nécessitées par les méthodes gravimétriques : 40 cm3 suffisent pour une urine de femme enceinte.

C'est une méthode qui, d'autre part, est assez laborieuse et qui nécessite l'emploi d'un réactif mal commode : l'hydrogène sulfuré. Ses multiples manipulations (trois précipitations successives et trois filtrations correspondantes : précipité d'hydroxyde cuivrique, précipité lors de la défécation mercurique, précipité de sulfures de cuivre et de mercure), peuvent entraîner des pertes par adsorption. De plus, la précipitation par l'hydrogène sulfuré entraîne la formation de précipités en partie colloïdaux dans les conditions de l'opération.

La réaction colorée finale est effectuée sur 2 cm3 d'une solution alcaline qui, selon l'auteur est « limpide et légèrement jaunâtre ». Dans ces conditions nous n'avons pas toujours réussi à obtenir les teintes vraiment comparables avec celles fournies par une gamme à base de glucurone, préparée comme il est indiqué dans la technique de M. JAYLE.

3°) LE MÉTHODE DE DOSAGE DU PRÉGNANDIOL de M. JAYLE, O. CREPY et P. WOLF (1943) (PRÉCIPITATION ACÉTONIQUE).

Les auteurs ont suivi les grandes lignes de la méthode de VENNING et remplacé la pesée du glucuronide extrait par un dosage colorimétrique de l'acide glucuronique (voir p. 52).

a) Les quatre extractions butyliques de VENNING sont remplacées par une seule extraction faite à pH 10. M. JAYLE et ses collaborateurs ont établi en effet que la totalité du glucuronide passait à pH 10, mais que la quantité de pigments entraînés était bien moindre qu'à la neutralité.

De plus, les dernières extractions entraînent plus d'impuretés que la première. Celle-ci est donc seule conservée ; en l'effectuant dans des conditions précisées d'agitation, un cœfficient de partage s'établit et 80 pour cent du prégnandiol est extrait. Un facteur de correction dans le calcul final tient compte de cette proportion.

Cette manière de procéder donne un premier résidu beaucoup plus pur qu'au stade correspondant de la méthode de VENNING. Elle permet de supprimer la redissolution de ce résidu dans la

soude décinormale et la 2e série de quatre extractions butyliques, remplacées par un seul lavage à la soude.

b) La cristallisation acétonique est légèrement modifiée. Les auteurs estiment qu'il y a intérêt à diminuer les quantités respectives d'acétone et d'eau employées (50 cm^3 au total au lieu de 100).

Nous avons fait d'ailleurs une remarque semblable (V. page 46)

c) Enfin, ils renoncent au dosage gravimétrique comme n'étant pas assez spécifique à la suite d'expériences de fractionnement des précipités obtenus par la technique de VENNING et d'irrégularités importantes remarquées dans les points de fusion (v. page 22).

Nous avons effectué un certain nombre de dosages de prégnandiol suivant la méthode de JAYLE CRÉPY et WOLF de 1943. La précision du mode opératoire fourni permet de les effectuer sans incidents.

La coloration obtenue, d'une belle teinte lilas est parfaitement comparable avec celle fournie par les tubes d'étalonnage.

La critique que nous lui adresserons, valable également pour la méthode de CRISMER, est de doser l'acide glucuronique et non le prégnandiol, de manquer par conséquent de spécificité, d'être, malgré la sélectivité relative de l'extraction, à la merci d'une élimination imprévue d'acide glucuronique conjugué (autres hormones ainsi conjuguées, produits médicamenteux), enfin de négliger le prégnandiol existant dans l'urine sous forme libre.

Par rapport à la méthode de VENNING, nous avons obtenu les résultats suivants : (tableau N° 8).

TABLEAU N° 8

	Méthode de VENNING	Méthode de JAYLE 1943	Rapport
Cas n° 1	21,1 mg.	17 mg.	80 pour cent
Cas n° 2	28,5 mg.	23,4 mg	82 pour cent
Cas n° 3	33,8 mg.	30 mg.	88 pour cent

(Résultats exprimés en prégnandiol par litre)

Les résultats fournis par la méthode de JAYLE (1943) sont donc pour les trois cas envisagés égaux à 83 pour cent, en moyenne, des résultats fournis par la méthode de VENNING.

Il peut être intéressant de signaler que nous avons pesé dans les cas n° 1 et n° 2 le précipité obtenu dans l'acétone. Le poids ainsi obtenu était nettement supérieur au poids calculé par colorimétrie.

	Gravimétrie	Colorimétrie
Cas n° 1	23 mg	17 mg
cas n° 2	37 mg	23,4 mg

Nous n'avons pas eu la possibilité d'expérimenter les modifications récentes de M. F. JAYLE et O. LIBERT.

MÉTHODE D'ALLEN ET VIERGIVER 1941 * [3]

Les particularités essentielles de ce procédé sont :

1°) L'extraction du prégnandiol glucuronide selon la méthode de VENNING.

2°) La précipitation sous forme de sel de plomb.

3°) L'hydrolyse et le dosage de l'acide glucuronique libéré par une méthode de dosage des sucres réducteurs. (Méthode de SCHAFFER, HARTMAN, SOMOGYI) [119].

Préparation de l'extrait urinaire.

L'urine de 24 heures est recueillie sous 300 cm3 d'alcool butylique. Le volume total est noté, non compris l'alcool butylique. L'urine est alors extraite par trois fois avec un volume d'alcool butylique, égal chaque fois au tiers du volume de l'urine. Les 300 cm3 d'alcool butylique présents durant la collecte sont considérés comme partie de la première extraction et on ajoute seulement assez d'alcool butylique pour l'amener au tiers du volume. Après agitation, le mélange est laissé en repos 24 heures entre les extractions. L'alcool butylique

(*) Méthode venue à notre connaissance à la fin de 1945.

extractif est concentré à volume convenable (500 cm3 d'habitude). Une partie aliquote contenant de 10 à 40 mg. de prégnandiol glucuronate de sodium est prise pour l'analyse. Dans les débuts de grossesse, 300 cm3 sont nécessaires mais après le 4e ou 5e mois, 200 cm3 suffisent.

Cette quantité aliquote est évaporée à sec sous vide et le résidu est dissous dans 60 cm3 de soude 0, I. N. Cette solution est extraite avec 3 fois 30 cm3 d'alcool butylique.

Ce second extrait butylique est évaporé à sec. Le résidu repris par 10 cm3 environ d'eau distillée est transvasé dans un tube à centrifuger de 15 cm3. On ajoute du nitrate de plomb 0,4 M jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de précipitation (1 cm3 de cette solution suffit en pratique). Une goutte ou deux sont ajoutées après centrifugation pour être certain que la précipitation est complète. La liqueur mère est rejetée et le précipité lavé avec 5 cm3 d'eau contenant quelques gouttes de solution de nitrate de plomb. Un agitateur de verre est employé pour mettre en suspension le précipité ; il est de nouveau employé dans l'extraction ci-dessous par le carbonate de soude.

L'eau de lavage éliminée, le précipité est extrait avec une solution de carbonate de sodium 0,08 N dans l'alcool à 60c. L'extraction est d'abord faite avec 5 cm3 de carbonate de sodium puis par deux fois, avec 2 cm3. Le tube est chauffé au bain-marie 3 à 5 minutes. Le précipité est plusieurs fois remis en suspension avec l'agitateur pendant le chauffage. Le tube est centrifugé entre les extractions et les liqueurs mères décantées dans une fiole jaugée de 10 cm3. Le volume est amené à 10 cm3 avec la solution alcoolique de $CO^3 Na^2$ (solution 1)

Dosage de l'acide glucuronique.

Deux cm3 de la solution alcoolique carbonatée (solution 1) sont mesurés dans une fiole jaugée de 10 cm3 en pyrex. On ajoute 1 cm3 de ClH 3,5 N., on bouche avec un petit bouchon de porcelaine et on chauffe 30 minutes au bain-marie bouillant.

Après refroidissement, la solution est neutralisée par la soude normale en présence de phénolphtaléine .Le volume est complété à 10 cm3 avec de l'eau ; après agitation la solution est filtrée sans lavage (solution 2).

L'acide glucuronique libéré par l'hydrolyse, est dosé selon la méthode de SCHAFFER, HARTMANN, SOMOGYI, pour les sucres réducteurs.

On prépare deux tubes en pyrex de 25 x 150 mm. contenant chacun 4 cm3 de la solution 2 ; un témoin également en double exem-

plaire est préparé en neutralisant 1 cm3 d'acide chlorhydrique 3,5 N., additionné de 2 cm3 de solution carbonatée (solution 1) et en complètant à 10 cm3 sans filtrer . Quatre cm3 de cette solution sont mesurés dans chacun des deux tubes à essai.

On ajoute aux quatre tubes 2 cm3 du réactif cupro alcalin de SCHAFFER, HARTMANN, SOMOGYI [119] (*). Les tubes bouchés sont chauffés 15 minutes au bain-marie bouillant, puis refroidis. On ajoute 3 cm3 de SO^4 H^2, O, 1 N. ; on agite. Finalement, on titre avec une solution d'hyposulfite de sodium 0,005 N.

Les résultats sont obtenus en soustrayant du nombre de centimètres cubes d'hyposulfite utilisé par les tubes hydrolysés, le nombre de centimètres cubes d'hyposulfite consommé par les témoins. La quantité de prégnandiolglucuronate de sodium est déduite en se rapportant à une courbe d'étalonnage.

Etablissement de la courbe d'étalonnage.

La courbe d'étalonnage est obtenue en mesurant les quantités d'hyposulfite équivalentes à des quantités connues de prégnandiol glucuronate de sodium pur. La préparation standard de prégnandiol glucuronate de sodium est dissoute dans la solution alcoolique de CO^3 Na^2, hydrolysée par CIH 3,5 N., neutralisée, etc... comme il est dit ci-dessus. Des témoins sont également préparés comme ci-dessus. Les points ainsi obtenus décrivent une droite de formule $y = 0{,}68\ X + 0{,}14$. Les résultats peuvent ainsi être lus directement.

Discussion.

Selon les auteurs, cette méthode demande à peu près le même temps que celle de VENNING. La sensibilité est du même ordre, le rendement, assez variable n'est pas descendu en dessous de 79 pour cent. La précipitation par le nitrate de plomb serait à peu près quantitative (93 à 99 pour cent) même pour les faibles concentrations en prégnandiol.

(*) REACTIF DE SCHAFFER, HARTMANN et SOMOGYI. — On dissout 25 g. de carbonate de sodium anhydre, 25 g. de bicarbonate de sodium et 25 g. de sel de Seignette dans 600 cm3 d'eau. On dissout d'autre part 7 g. de sulfate de cuivre dans 100 cm3 d'eau.

Les deux solutions sont mélangées. On ajoute alors 10 g. d'iodure de potassium, 5 g. d'oxalate de potassium et 22 cm3 de solution normale de biiodate de potassium alcalin. Cette dernière solution est préparée par dissolution de 32,498 g. de (IO^3) 2HK et de 83,3 cm3 de potasse ou de soude normale dans un litre d'eau.

La solution cupro-alcaline est complétée à un litre et titrée au moyen d'hyposulfite 0,005 N.

Les auteurs ont considéré comme superflue la quatrième extraction butylique de la méthode de VENNING, la quantité enlevée ne représentant que 0 à 3 pour cent du total. Cette constatation est à rapprocher de celle de M. F. JAYLE (p. 57).

Comme toutes les méthodes dosant la fraction glucuronique, celle-ci manque de spécificité. Au cours de la grossesse, une petite quantité d'androgène glucuro-conjugué, assez constante, est dosée comme prégnandiol. Ces androgènes pourraient être dosés colorimétriquement et déduits : en fait, ils représentent moins de 10 pour cent du total, ce qui est sans importance clinique [113].

Cependant, l'œstrilglucuronide, abondant à la fin de la gestation, ne trouble pas les résultats ; il est en effet éliminé pour la plus grande part au cours du lavage à la soude.

Ces difficultés sont plus grandes chez la femme non enceinte. L'urine contient alors une substance précipitable par le plomb, réduisant le réactif, probablement d'après les auteurs, un androgène glucuro conjugué. Cette substance apparaît même pendant la première moitié du cycle, et représente, exprimé en prégnandiol, 10 à 20 mg. par jour.

La méthode d'ALLEN et VIERGIVER a été peu appliquée. Les auteurs indiquent pendant la grossesse des taux identiques à ceux signalés par VENNING.

CHAPITRE III

METHODE DE D. BEALL (1937)

L'originalité de la technique de Desmond BEALL [8] publiée en 1937, repose sur une adsorption préalable par l'acide benzoïque du prégnandiol libre et estérifié.

L'adsorbat benzoïque est ensuite traité par l'acétone qui dissout l'acide benzoïque et une grande partie des substances adsorbées, dont le prégnandiol total (*). Le résidu d'évaporation de cette solution acétonique est hydrolysé par ébullition en milieu chlorhydrique, puis extrait par le toluène en milieu alcalin. Le prégnandiol est séparé par cristallisations successives dans l'éther de pétrole et l'acétone.

EXPOSE DE LA TECHNIQUE

REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES.

Benzoate de sodium.

Acide chlorhydrique à 5 pour cent. Acide chlorhydrique 0,25 N. Hydroxyde de sodium à 10 pour cent. Hydroxyde de sodium 2 N. Toluène - Ether de pétrole.

Acétone. Alcool éthylique à 90C 95C.

Appareil à extraction continue dans lequel la phase aqueuse est maintenue à 69° - 70°, et continuellement agitée.

A défaut, on peut employer, comme l'indique KNOPPERS [78] une bouteille Thermos et une ampoule à décantation.

(*) Le résidu insoluble dans l'acétone contient les hormones gonadotropes : BEALL eut en effet l'idée d'extraire le prégnandiol d'acétones de lavages provenant d'applications industrielles du procédé de KATZMANN et DOISY [76]. Ceux-ci (1932), reprirent le procédé d'extraction de l'insuline de MOLONEY et FINDLAY [107] (1923), par absorption sur un précipité d acide benzoïque créé dans le milieu à purifier ; ils l'appliquèrent à l'urine pour en extraire les hormones de l'antehypophyse de structure protidique comme l'insuline. Ils agitèrent vigoureusement l'urine avec une solution saturée d'acide benzoïque dans l'acétone : l'acide benzoïque précipite. Le précipité recueilli est de nouveau dissous dans l'acétone. La fraction insoluble dans ce solvant contient les principes gonadotropes, c'est de la fraction soluble que D. BEALL extrait le prégnandiol.

TECHNIQUE

La technique initiale publiée par BEALL [8] convient plutôt à une extraction industrielle qu'à un dosage puisqu'elle s'applique à 45 litres d'urine. Nous donnons ci-dessous une technique appliquée à 500 cm3 semblable à celle indiquée dans le travail de A.T. KNOPPERS [78].

11 grammes de benzoate de soude sont ajoutés à 500 cm3 d'urine. Le pH est amené alors à 2,5 - 2,0 par addition d'acide chlorhydrique (HCL à 5 pour cent). Le liquide dans lequel l'acide benzoïque précipite est agité pendant deux heures. Le précipité est recueilli par filtration et agité dans 120 cm3 d'acétone. La solution acétonique est évaporée.

Le résidu (acide benzoïque brut) sera traité différemment selon que l'on extrait séparément le prégnandiol libre et le prégnandiol estérifié ou, dans une seule opération, le prégnandiol total.

1 - *Extraction du prégnandiol libre.*

L'acide benzoïque brut est dissous dans un léger excès de soude. (HO Na à 10 pour cent), puis extrait par 60 cm3 de toluène. (Agitation constante à t = 65°-70° pendant 4 heures). L'extraction dans ces conditions, en employant un appareil continu serait complète. Après décantation, la partie aqueuse est mise de côté. (cf 2°). Le toluène est lavé avec 20 cm3 de soude 2 fois normale, puis quatre fois avec 15 cm3 d'eau (*). Il est enfin évaporé sous pression réduite : le résidu épuisé par l'éther de pétrole bouillant au réfrigérant à reflux 5 à 10 minutes : la solution éthérée, mise à la glacière 4 ou 5 heures, abandonne du prégnandiol. Ce produit, repris par l'acétone chaude donne un corps de P.F. 230° - 232°, qui, recristallisé dans l'alcool éthylique, fond à 237° - 237°,5 (BEALL).

2 - *Extraction du prégnandiol estérifié.*

La partie aqueuse mise de côté (voir plus haut) est amenée à pH2. Le précipité ainsi provoqué, recueilli, est mis en suspension dans 100 cm3 d'acide chlorhydrique 0,25 N. L'hydrolyse est obtenue par ébullition pendant deux heures.

La solution est ensuite alcalinisée par la soude jusqu'à réaction alcaline au tournesol, pour être extraite par le toluène comme il est dit ci-dessus.

(*) KNOPPERS agite à ce moment le toluène avec du sulfate de sodium anhydre, pour le dessécher parfaitement.

3 - *Extraction du prégnandiol total.*

L'acide benzoïque brut est mis en suspension dans l'acide chlorhydrique 0,25 N (10 litres par Kg. d'acide benzoïque soit 100 cm3 dans le cas de 500 cm3 d'urine.)

La solution est ensuite traitée comme au paragraphe 2 (alcalinisation, extraction au toluène, etc...)

CRITIQUE DE LA METHODE BEALL

D. BEALL dans sa communication étudie particulièrement certains points de sa technique.

1°) L'ADSORPTION BENZOIQUE.

L'adsorption par précipitation d'acide benzoïque au sein de la solution doit s'effectuer entre pH 2,0 et pH 2,5. La quantité adsorbée décroît de moitié à pH 4. Elle décroît encore plus vite si l'acidité augmente et s'annule pratiquement à pH 1.

2°) LE RENDEMENT DE L'ADSORPTION.

L'auteur a cherché à extraire le prégnandiol qui pourrait rester dans l'urine après le traitement par l'acide benzoïque.

Les quantités extraites, à partir de grands volumes d'urine, (200 litres) étaient souvent nulles : le plus haut rendement en prégnandiol libre fut de 0,8 mg. par litre, et en prégnandiol combiné 1 à 2 mg.

COPE [30] estime que les urines après adsorption benzoïque contiennent encore 15 pour cent du prégnandiol glucuronide total, quelque soit le pH d'adsorption. Ce reliquat est extractible par l'alcool butylique.

Il reste donc tout de même une petite quantité de prégnandiol dans l'urine après le traitement benzoique.

3°) L'HYDROLYSE

L'hydrolyse du prégnandiol glucuronate de sodium par Cl H est d'abord essayée à pH 1,0 par chauffage à l'autoclave à 120° pendant deux heures.

Une étude du rendement montra qu'il était préférable d'opérer

par simple ébullition de 2 heures en milieu 0,25 N. La destruction dans ce cas est faible car une ébullition de 4 heures donne un chiffre sensiblement égal.

Il faut remarquer que M. BEALL considère sa méthode plus comme une technique d'extraction que comme un procédé de dosage. Il pense qu' « elle peut servir au dosage quantitatif de l'urine et que ceci doit être étudié plus tard ».

Nous n'avons pas eu connaissance de ces travaux.

A. T. KNOPPERS [78] en 1940, cherchant à doser le prégnandiol dans l'urine de certains animaux de laboratoire, applique la méthode de BEALL à des volumes d'urines de 500 cm^3. La technique initiale de BEALL étant prévue pour 45 litres d'urine, il a réduit toutes les quantités de réactif et de solvants en proportion.

Les rendements qu'il obtient sont très petits.

ROBEY [117] compare la technique de BEALL à celle de VENNING et obtient des rendements inférieurs et un produit final impur « dont le point de fusion s'écarte notablement de 234° » (aucun autre détail numérique n'est indiqué).

COPE [30] a comparé les méthodes de BEALL et de VENNING. Les résultats en produits bruts sont très voisins ; après purification les chiffres fournis par la méthode de BEALL sont inférieurs. La moyenne de 5 essais donne les résultats suivants :

VENNING (1ère précipitation) 38,7 mg.

BEALL (avant cristallisation) 38,5 mg.

VENNING (2e précipitation) 24,3 mg.

BEALL (recristallisé) 16,5 mg.

Il attribue cette différence à la solubilité du prégnandiol libre dans l'acétone.

Nous avons employé à diverses reprises la méthode de BEALL.

Nous avons pu nous procurer des quantités assez importantes d'un produit d'adsorption benzoïque correspondant à la matière première employée par BEALL et provenant également de la préparation des hormones gonadotropes. (*)

Ce produit, résidu d'évaporation des acétones de lavages de

(*) Grâce à l'obligeance de l' « Industrie Biologique Française » à Pantin.

l'adsorbat benzoïque) était constitué par de l'acide benzoïque fortement souillé par les pigments urinaires.

Il a été traité conformément à la technique de BEALL.

5 essais ont été effectués sur des quantités d'acide benzoïque brut de 500 à 1.500 grammes, correspondant à 200 ou 300 litres d'urine. Les rendements obtenus, en prégnandiol, furent toujours très faibles (dans le meilleur cas 35 cg., correspondant à 205 litres d'urines de femme enceinte, soit 1,7 mg. par litre).

Les extraits toluéniques obtenus étaient toujours considérablement souillés par des substances goudronneuses noirâtres très difficiles à éliminer.

Nous avons effectué quelques dosages de prégnandiol selon la méthode BEALL modifiée par KNOPPERS. Ces dosages ont été pratiqués sur un litre ou un demi-litre d'urine de femmes enceintes; un dosage comparatif selon la technique de VENNING était toujours pratiqué sur une deuxième fraction de la même urine. (Tableau n° 9)

Résultats exprimés en prégnandiol par litre.

(Facteur de transformation pour les VENNINGS : 0,597.)

TABLEAU N° 9

	Méthode de BEALL	Méthode de VENNING	Rapport
Essai n° 1	10,2	7,4	137 pour cent
» n° 2	10,8	13,1	83 pour cent
» n° 3	17,4	21,1	87 pour cent
» n° 4	23,8	33,8	70 pour cent
» n° 5	24,8	28,5	85 pour cent

Le prégnandiol obtenu dans tous les cas présentait un point de fusion de 230° — 232° correspondant à un produit très légèrement souillé. Un seule cristallisation acétonique et une seule cristallisation alcoolique étaient effectuées.

Si l'on met à part dans ce tableau l'essai n° 1 dans lequel le chiffre obtenu par la technique de BEALL est supérieur à celui obtenu par la technique VENNING, résultat qui peut s'expliquer

par une hydrolyse spontanée du glucuronide due à une mauvaise conservation de l'urine traitée, il apparaît que, d'une façon générale, la méthode de BEALL, appliquée à des urines de grossesse riches en prégnandiol fournit des résultats inférieurs à la méthode de VENNING.

La proportion moyenne pour les cas n° 2, 3, 4, 5 est de 81 pour cent.

Ces résultats sont assez inattendus puisque la méthode de BEALL doit théoriquement doser non seulement le prégnandiol combiné, mais aussi le prégnandiol libre. Il se peut que le rendement de l'adsorption benzoïque ne soit pas parfait ; la cristallisation dans l'acétone d'autre part amène certainement des pertes, vu la solubilité assez grande du prégnandiol dans ce solvant (de l'ordre de 200 mg. pour 100 cm^3). Solubilité dix fois plus considérable que celle du glucuronide à 25° dans les mêmes conditions. (*)

Mais d'un autre côté, il ne faut pas oublier que les résultats de la méthode de VENNING sont le plus souvent entachés d'une erreur par excès due aux impuretés tenaces accompagnant le précipité.

(*) Ces conclusions concordent avec celles de COPE [30] dont nous avons eu connaissance en cours de rédaction.

CHAPITRE IV

MÉTHODE DE F.B. ASTWOOD ET G.E.S. JONES 1941 (6)

L'hydrolyse du prégnandiol glucuronide est réalisée par ébullition de l'urine, additionnée d'acide chlorhydrique en présence de toluène.

Le prégnandiol se rassemble au fur et à mesure de sa libération dans ce solvant, ce qui le protège contre une destruction éventuelle.

Le toluène extractif est lavé à l'eau, puis à la soude alcoolique selon une technique particulière. Le prégnandiol est finalement séparé et purifié par précipitation par l'eau à partir d'une solution alcoolique. On termine par une pesée, la pureté du produit étant contrôlée par la mesure du point de fusion.

EXPOSE DE LA TECHNIQUE

REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES.

Toluène.
Acide chlorhydrique pur. (D = 1,19)
Solution de soude à 2 pour cent dans l'alcool méthylique absolu.
Soude décinormale.
Alcool éthylique à 95°.
Ballon muni d'un réfrigérant à reflux (*). Entonnoir de Büchner.

L'urine est recueillie en présence de toluène comme antiseptique. Un litre d'urine est mis dans un ballon de deux litres ; on ajoute 50 cm^3 de toluène.

Le ballon est muni d'un réfrigérant à reflux. L'urine est portée à l'ébullition : on ajoute alors 100 cm^3 de Cl. H concentré par petites fractions à travers le réfrigérant. On continue l'ébullition pendant 15 minutes. La température du mélange varie de 100° à 105°. Le bal-

(*) L'emploi d'un réfrigérant terminé par un entonnoir à l'extrémité supérieure est pratique.

lon est refroidi par immersion dans un récipient d'eau froide en évitant de secouer car il se déclancherait une violente ébullition. Le contenu refroidi est versé dans une ampoule à décantation. Le toluène, fortement coloré, et la couche d'émulsion (toluène-urine) sont séparés ; on extrait deux fois l'urine restante avec 25 cm3 de toluène.

Les extraits toluèniques (toluène et émulsion) sont filtrés sur l'entonnoir de Büchner avec un vide léger. Il reste sur le papier filtre un résidu brun qui est lavé avec de petites quantités de toluène. Si cette filtration est effectuée sans vide excessif, l'émulsion se détruit complètement. Le filtrat est versé dans une ampoule à décantation, la couche d'urine éliminée et la phase toluénique lavée une fois avec 50 cm3 d'eau.

Le toluène est alors versé dans un ballon de 400 cm3 parfaitement sec ; il est porté à l'ébullition sur une plaque chauffante électrique jusqu'à ce que les dernières traces d'eau aient disparu. On ajoute 10 cm3 d'une solution de soude à 2 pour cent dans l'alcool méthylique absolu. L'ébullition de l'alcool est maintenue jusqu'à ce qu'il soit complètement éliminé et le toluène est réduit à la moitié du volume initial. On laisse cet extrait à la température du laboratoire jusqu'à refroidissement et on le filtre sous vide léger dans une fiole d'Erlenmeyer de 125 cm3. Le précipité gélatineux abondant restant sur le filtre est lavé avec soin avec de petites quantités de toluène. Le filtrat ne doit pas être coloré en rose ou en brun, autrement on doit recommencer l'étape précédente.

Le filtrat clair, de couleur vert jaunâtre, est évaporé à sec sur la plaque chauffante, et les dernières traces de toluène sont chassées par un courant d'air pour éviter la surchauffe du résidu. Celui-ci est dissous dans 10 cm3 d'alcool éthylique à 95° à chaud, tout en continuant le chauffage on ajoute lentement 40 cm3 de soude aqueuse 0,1 N, chaude. Le flacon est mis au cryostat toute la nuit.

Le précipité, recueilli par filtration, lavé à l'eau, est redissous dans 10 cm3 d'alcool à 95° et précipité une deuxième fois de la même façon, mais avec 40 cm3 d'eau distillée au lieu de soude.

Le prégnandiol ainsi obtenu doit être incolore et cristallin.

Sinon, on doit faire une nouvelle précipitation à partir de l'alcool.

Le produit purifié est alors recueilli par filtration, transporté à l'aide de l'alcool éthylique dans une fiole tarée, desséché à l'étuve à 90° et pesé.

On prend le point de fusion de chaque échantillon recueilli et s'il est inférieur à 220°, on mesure le point de fusion après mélange avec du prégnandiol pur.

Quand le produit obtenu est presque entièrement composé de prégnandiol pur, son point de fusion est alors augmenté. La détermination est satisfaisante s'il n'y a pas de diminution du point de fusion.

G.E.S. JONES a donné avec E. DELFS et H.M. STRAN en 1944 [74] une nouvelle rédaction de cette technique avec quelques modifications de détail ; ces auteurs emploient comme conservateur de l'urine après son émission le paraaminophénylsulfamide (2 g. pour 1.000)

CRITIQUE DE LA METHODE DE F.B. ASTWOOD ET G.E.S. JONES

Les auteurs ont eux-mêmes discuté les principaux points de leur technique.

HYDROLYSE.

Les rendements varient assez considérablement avec la concentration en acide et le temps d'ébullition.

En travaillant avec de l'urine masculine additionnée de prégnandiol glucuronate de sodium, les auteurs ont obtenu les rendements suivants :

5 pour cent d'acide chlorhydrique : hydrolyse lente. Rendement maximum : 60 pour cent (une heure d'ébullition).

10 à 15 pour cent d'acide chlorhydrique : hydrolyse rapide. Rendement maximum : 70 pour cent. En 10 minutes d'ébullition).

Une baisse de ce rendement se produit si le temps d'hydrolyse est prolongé.

Si on effectue l'hydrolyse en présence de toluène, la destruction est évitée pour la majeure partie.

Dans ces conditions (50 cm^3 de toluène pour 1.000 de solution de prégnandiolglucuronate de sodium, 100 cm^3 d'acide chlorhydrique, 15 minutes d'ébullition), le rendement atteint 80 pour cent. La destruction commence au bout d'une heure d'ébullition.

2°) EXTRACTION PAR LE TOLUÈNE.

Le toluène présent pendant l'hydrolyse dissout 85 pour cent du prégnandiol libéré, le reste passe dans la 2e extraction. Le 3e extrait en contient quelquefois des traces.

Le volume total du toluène est suffisant pour tout enlever, « la solubilité n'excédant pas 2 mg. par cm^3 dans ce solvant. »

3°) PRECIPITATION DES IMPURETES DE L'EXTRAIT TOLUENIQUE.

Les auteurs insistent sur la nécessité de déshydrater le toluène extractif aussi parfaitement que possible, l'eau en excès pouvant introduire des impuretes qui ne seraient pas éliminées par la suite.

Les impuretés précipitées à la fin du traitement par la soude alcoolique n'entraînent que des quantités négligeables de prégnandiol. Des essais de récupération à partir de ces précipités, effectués par ASTWOOD et JONES ont donné des résultats négatifs.

4°) PRECIPITATION A PARTIR DE L'ALCOOL HYDRATÉ.

L'expérience montre qu'il n'y a pas de perte sensible à condition d'employer 30 cm^3 d'eau au moins pour 10 cm^3 d'alcool (mélange conduisant à de l'alcool à 19 °C). Dans ces conditions, la présence de substances neutres comme le cholestérol ne gêne pas, de grandes quantités d'autres liquides amèneraient probablement de petites pertes.

Parmi les subtances possibles, le cholestérol et l'heptacosane donnent dans l'alcool à 19° des solutions colloïdales qui passent à travers les filtres. L'androstérone en fortes concentrations précipiterait en petits cristaux ; mais il faut pratiquement pour que ces diverses substances constituent une gêne, des concentrations qui ne sont jamais rencontrées dans l'urine humaine normale. (16 mg. par litre de cholestérol, 8 mg. d'androstérone, 16 mg. d'heptacosane).

5°) ESSAIS PERSONNELS.

N'ayant eu connaissance de la méthode d'ASTWOOD et JONES que tardivement, du fait des circonstances, nous l'avons assez peu utilisée. Néanmoins, nous l'avons essayée au cours de dosages faits comparativement avec la technique de VENNING sur des urines de femme enceinte (voir tableau n° 10).

La méthode se présente comme d'emploi facile : elle donne des résultats supérieurs à ceux de la technique de VENNING ce qui peut s'expliquer facilement : elle dose en effet le prégnandiol libre,

soit qu'il ait été éliminé ainsi, soit qu'il y ait eu hydrolyse spontanée après l'émission. La plus value est de l'ordre de 10 à 20 pour cent. (moyenne sur trois séries de dosages : 14 pour cent).

Nous avons toujours eu affaire, lors de la précipitation à partir de l'alcool aqueux aux solutions colloïdales dont il a été question plus haut (paragraphe 4). Ces solutions colloïdales, résistant aux centrifugations prolongées, sont dues probablement au cholestérol et à l'heptacosane ; elles passent parfaitement à travers les filtres et ne semblent pas gênantes.

Le produit final obtenu se présente sous l'aspect de petites tâches blanchâtres : les points de fusion étant au voisinage de 220°.

Tableau n° 10

	Méthode d'ASTWOOD	Méthode de VENNING	Pourcentage par Rapport au Venning
Essai n° 1	34,8 mg.	28,5 mg.	122 pour 100
Essai n° 2	42,9 mg.	33,8 mg.	126 pour 100
Essai n° 3	20,0 mg.	21,1 mg.	95 pour 100

Résultats exprimés en prégnandiol par litre

CHAPITRE V

LA REACTION DE TALBOT ET LES METHODES QUI EN DERIVENT (*)

TALBOT et ses collaborateurs [128] ont signalé et appliqué en 1941 un moyen de dosage colorimétrique du prégnandiol. La réaction colorée est très simple : on fait agir sur le prégnandiol (forme libre) de l'acide sulfurique. Il se développe une coloration orangée. Cette coloration examinée dans une zone déterminée du spectre, est considérée par les auteurs comme suffisamment spécifique pour permettre un dosage, à condition que le prégnandiol en jeu soit suffisamment pur.

Deux méthodes emploient cette réaction colorée, combinée à des procédés d'hydrolyse et de purification plus ou moins inspirés de la technique d'ASTWOOD et JONES [5] ; une méthode quantitative, la méthode de TALBOT, BERMAN, MAC LACHLAN, WOLFE [128] ; une méthode plus spécialement quantitative : celle de GUTERMAN [48].

BERMAN, MAC LACHLAN, WOLFE 1941 (128) METHODE DE TALBOT

Cette méthode permet de doser à la fois le prégnandiol et les 17 cétostéroïdes α et β alcooliques et non alcooliques.

La méthode comprend :

(*) Nous avons eu connaissance des travaux de TALBOT et GUTERMAN en cours de rédaction grâce à l'obligeance de Mr. M. JAYLE (février 1946). Le temps nous a manqué pour les expérimenter.

a) L'hydrolyse par 15 pour 100 de Cl. H pendant 6 heures, et l'extraction par le tétrachlorure de carbone des stéroïdes urinaires, pratiquées simultanément dans un appareil spécial décrit d'autre part.

b) Le tétrachlorure de carbone extractif est évaporé ; le résidu repris par 4 cm^3 d'alcool absolu et 150 cm^3 d'acétate d'éthyle. Cette solution est lavée quatre fois avec 25 cm^3 de soude normale à chaque fois, puis évaporée à sec.

c) Les stéroïdes neutres sont séparés en fraction cétonique et non cétonique par le réactif de GIRARD.

d) La fraction cétonique est dosée colorimétriquement comme il est décrit d'autre part.

La fraction non cétonique (prégnandiol) est purifiée par le procédé d'ASTWOOD et JONES : reprise par le toluène, addition de soude en solution dans l'alcool méthylique, évaporation de celui-ci, filtration, évaporation du filtrat à siccité, reprise par l'alcool, précipitation par addition d'eau.

Le précipité de prégnandiol ainsi obtenu est repris par l'alcool. Cette solution est utilisée pour la réaction colorée.

Dosage colorimétrique.

Une fraction aliquote de la solution alcoolique de prégnandiol est évaporée à sec dans une cuve photométrique. On ajoute 10 cm^3 d'acide sulfurique concentré. Au bout de 20 minutes, on fait la lecture électro-photométrique. Il faut utiliser un filtre avec maximum de transmission pour 420 mμ (380 à 480 mμ)

On se rapporte à un facteur d'étalonnage.

Rendement.

Plus de 90 pour cent du prégnandiol présent est extrait au cours de l'hydrolyse-extraction.

Le rendement final de la méthode est de l'ordre de 61 pour cent inférieur à celui de la méthode d'ASTWOOD (68 pour cent). Le rendement est meilleur pour les 17 cétostéroïdes.

METHODE QUALITATIVE DE GUTERMAN 1944 (48)

L'auteur présente sa méthode comme un « test de la grossesse » (v. p. 133). C'est une combinaison de la méthode d'ASTWOOD et JONES et de la réaction colorée de TALBOT. Elle présenterait des avantages de simplicité et de rapidité (3 heures).

100 cm^3 d'urine du matin sont additionnés de 50 cm^3 de toluène et de 10 cm^3 d'acide chlorhydrique ; on porte 15 minutes à l'ébullition. La couche toluénique décantée est lavée par la soude 0,10 N (2 fois 15 cm^3) et l'eau (2 fois 15 cm^3). On ajoute ensuite 10 cm^3 de soude à 2 pour cent en solution méthylique. L'alcool méthylique est éliminé par chauffage, le volume réduit au demi. On filtre.

Le filtrat est évaporé à sec. Le résidu est repris par 5 cm^3 d'acétone et additionné de 20 cm^3 de soude 0,10 N. Un précipité se dépose (à la glacière). Ce précipité recueilli, lavé, est repris par 10 cm^3 d'alcool absolu chaud et filtré.

Sur le filtrat évaporé à sec on effectue la réaction de TALBOT par addition de 10 cm^3 d'acide sulfurique concentré. Une coloration se développe :

Si la coloration est JAUNE, la réaction est négative.

Si la coloration est ORANGÉE ou orangé profond, la réaction est positive.

L'auteur estime que la réaction positive est suffisante pour diagnostiquer une grossesse, les quantités éliminées au cours du cycle normal ne la donnant pas dans ces conditions.

La spécificité est basée sur la bande d'absorption de 430 m μ au spectrophomètre. Le produit précipité a le point de fusion du prégnandiol. L'œstrone, l'œstradiol, le cholestérol, l'androstérone, ne seraient pas gênants.

Nous n'avons pas essayé ces techniques ; cependant la spécificité de la réaction colorée à l'acide sulfurique nous paraît assez relative.

CHAPITRE VI

METHODE DOSANT LE PREGNANDIOL LIBERE PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE

Nous groupons ici trois techniques très différentes mais reposant sur une base commune : leurs auteurs, conscients des pertes causées par l'hydrolyse acide ont cherché à réaliser le dédoublement du prégnandiol conjugué au moyen des enzymes : enzymes d'origine bactérienne (WEIL), émulsine (VEITCH), glucuronidase (TALBOT).

Nous avons essayé, sans grand résultat, la méthode de WEIL ; nous n'avons pas eu la possibilité d'expérimenter les autres. Néanmoins, l'idée est séduisante ; l'hydrolyse enzymatique permettant seule d'éliminer les pertes obligatoires qui accompagnent l'hydrolyse acide.

METHODE D'ISOLEMENT DE WEIL 1938 (144)

Paul G. WEIL a publié cette technique comme une « méthode d'isolement du prégnandiol de l'urine de jument gravide ». Une application à l'urine humaine, annoncée par l'auteur, n'est pas venue à notre connaissance.

L'originalité de la méthode de WEIL qui dose le prégnandiol libre repose sur le procédé d'hydrolyse (*). L'urine est maintenue sans addition d'antiseptique 96 heures à l'étuve à 37°. Le prégnandiol est libéré par une diastase bactérienne. L'urine est filtrée (sous vide). Le prégnandiol se trouve dans le précipité restant sur le filtre. Celui-ci est recueilli et traité par l'alcool à 95° à chaud. La

(*) Voir à propos de l'hydrolyse spontanée du prégnandiolglucuronide la note page 36.

liqueur alcoolique est filtrée (sous vide). Le filtrat est évaporé à siccité et le résidu repris par 10 cm^3 d'acétone et 10 cm^3 de soude 0,10 N.

Quand la dissolution est complète, à chaleur modérée, le volume est complété à 50 cm^3 par addition de 30 cm^3 de soude décinormale. La solution est mise à la glacière et le prégnandiol précipité.

Le précipité est recueilli par filtration, lavé à l'eau chaude, dissous dans le minimum d'acétone chaude et additionné de deux volumes de soude décinormale. On met de nouveau à la glacière pour précipiter le prégnandiol. Une troisième purification en utilisant le minimum d'alcool éthylique et deux volumes d'eau donne habituellement un produit pur. Appliquée telle qu'elle est décrite ici, cette technique nous a donné de mauvais rendements comparés à la méthode de VENNING, sauf une fois. (voir tableau n° 11)

Tableau n° 11

Expérience	Méthode de VENNING	Méthode de WEIL	Rendement par rapport au VENNING
N° 1	21,1 mg.	11 —	34 pour cent
N° 2	28,5 —	28 —	38 pour cent
N° 3	33,8 —	7,3 mg.	82 pour cent

soit en moyenne 40 pour cent
(résultats exprimés en prégnandiol)

TECHNIQUE DE VEITCH, MILONE, EVERITT 1938 (133)

Les auteurs se basant sur la structure identique des β glucuronides et des β glucosides, effectuent l'hydrolyse au moyen de l'émulsine. L'opération est faite directement dans l'urine à pH 6,0 environ. De faibles concentrations d'émulsine suffisent pour obtenir une hydrolyse rapide. Le prégnandiol ainsi libéré est extrait

selon une modification de la technique d'extraction de KATZMAN et DOISY [76]. On obtient ainsi un produit de grande pureté P.F. 235°), présent dans l'urine de grossesse en quantités supérieures à celles indiquées par les autres chercheurs.

Nous n'avons pas eu connaissance d'une référence ultérieure où les auteurs se proposent de décrire plus amplement le procédé.

METHODE QUANTITATIVE DE TALBOT, RYAN, WOLFE 1943 (130)

Les auteurs, constatant que l'hydrolyse chlorhydrique est accompagnée de 30 pour cent de pertes, ont essayé d'employer dans ce but la β glucuronidase préparée selon la méthode de FISHMAN [42] à partir de la rate de bœuf. Les résultats avec cette diastase ne s'avérant pas satisfaisants, les auteurs ont préparé une nouvelle enzyme à partir du foie de rat, selon les idées (non publiées) d'ASTWOOD. Cette enzyme, donnant de bons résultats, est à la base de la méthode décrite ci-dessous.

TECHNIQUE

1 - *Préparation de l'enzyme.*

Six foies frais de rats adultes sont broyés au mortier ; on ajoute de l'acétone peu à peu en agitant, jusqu'à concurrence de 10 fois le volume initial. L'acétone surnageante est décantée 15 minutes plus tard et remplacée par un égal volume d'acétone neuve.

On agite de nouveau et on filtre sur entonnoir de BUCHNER. Le résidu est lavé trois fois avec de l'éther, puis séché. Il est aussitôt tamisé à travers une passoire à thé. La poudre ainsi dégraissée qui passe à travers la passoire contient l'enzyme. Elle peut être conservée un mois dans un flacon noir à la glacière.

2 - *Extraction du prégnandiolglucuronate de sodium urinaire.*

L'urine est recueillie avec 200 cm³ d'alcool butylique normal comme conservateur. Un extrait butylique lavé et séché est préparé suivant les principes indiqués dans une communication antérieure des mêmes auteurs. [129]

3 - *Hydrolyse enzymatique.*

Le résidu de l'extrait butylique séché est dissous dans 15 cm3 d'eau distillée ou plus, additionnée de 10 cm3 de solution tampon d'acétate de sodium 0,10N ajusté à pH 5,0 et de 100 mg. de poudre d' « enzyme de foie de rat » ; le tout est mis 4 heures à l'étuve à 37°.

4 - *Extraction du prégnandiol libéré.*

Le mélange refroidi est filtré (papier WHATMAN n° 2). Le précipité qui contient le prégnandiol libre, insoluble, est lavé sur le filtre avec 3 fois 5 cm3 d'eau. Le filtrat et les eaux de lavage sont rejetés. Le prégnandiol est alors extrait du précipité par lavage avec 4 fois 5 cm3 d'alcool à 95C chaud (au moins). L'extrait alcoolique est évaporé à sec au bain-marie ; le résidu d'évaporation est dissous dans 10 cm3 d'alcool à 95C chaud et le prégnandiol est précipité de cette solution alcoolique par addition lente de 40 cm3 d'eau.

5 - *Le précipité recueilli est évalué colorimétriquement.*

Au moyen de la méthode de TALBOT, BERCHMAN, MAC LACHLAN, WOLFE, déjà indiquée page 69.

CONCLUSION DES AUTEURS

La méthode a été essayée avec du prégnandiol glucuronate de sodium recristallisé (P.F. 279°-280°). Elle a permis d'obtenir un prégnandiol authentifié par son point de fusion (236°-237°) avec un rendement moyen de 89 pour cent.

Ce rendement est excellent et supérieur à ceux obtenus par hydrolyse acide.

TROISIEME PARTIE

CHOIX D'UNE TECHNIQUE

METHODE PROPOSEE

CHOIX D'UNE TECHNIQUE

Lorsque ce travail a été entrepris, à la fin de 1942, les méthodes de dosage du prégnandiol connues en France permettaient d'obtenir des résultats valables avec les urines de femme enceinte ; avec les urines recueillies au cours du cycle menstruel les résultats se révélaient peu satisfaisants et d'interprétation délicate [108].

Tout en pratiquant avec la méthode de VENNING les recherches dont les résultats trouvent place dans la quatrième partie de cet ouvrage, l'étude critique de ces diverses techniques nous a conduit à envisager la mise au point d'un nouveau procédé de dosage.

1° CETTE METHODE DOIT POSER A LA FOIS LE PRÉGNANDIOL COMBINÉ ET LE PRÉGNANDIOL LIBRE.

L'importance de cette dernière fraction étant pratiquement inconnue, on ne pouvait « a priori » la considérer comme négligeable. Ceci nous amène à prévoir une hydrolyse au début des opérations.

2° LES MÉTHODES GRAVIMÉTRIQUES (VENNING, ASTWOOD, etc.) ne sont sûres que dans la mesure où le produit pesé est pur, ce qui oblige à des purifications parfaites entraînant malheureusement des pertes. D'autre part, la prise du point de fusion d'un produit impur prête à discussion sur son identité.

3° L'évaluation indirecte du prégnandiol par DOSAGE DE LA COPULE GLUCURONIQUE manque également de spécificité et ne tient pas compte du prégnandiol libre.

4° Nous avons donc cherché à doser par COLORIMÉTRIE le prégnandiol TOTAL. Si la réaction colorée est suffisamment spécifique, nous pourrons alors nous contenter d'une purification relative sous condition que les impuretés résiduelles ne troublent pas la coloration obtenue.

Nous avons employé dans ce but la réaction colorée obtenue avec le pentachlorure d'antimoine et décrite plus loin (chapitre I, v. p. 85). Le procédé de dosage proposé, décrit au chapitre II (v. p. 96), se résume ainsi :

1°) hydrolyse acide de l'urine ;

2°) extraction par un solvant (éther) au moyen d'un appareil continu ;

3°) purification de cet extrait par la soude, puis par le charbon activé ;

4°) dosage colorimétrique au moyen de la réaction du pentachlorure d'antimoine sur l'extrait ainsi purifié. Le procédé d'extraction a été conçu dans le sens du plus grand rendement : extraction au moyen d'un appareil continu à grand débit de solvant ; suppression des précipitations et cristallisations de crainte de solubilités résiduelles.

Toutes les purifications sont pratiquées au sein d'un bon solvant du prégnandiol.

Malgré ces précautions, il y a cependant des pertes. Elles doivent être attribuées pour leur majeure partie à l'hydrolyse acide. Celle-ci, choisie par sa simplicité, serait probablement remplacée avec avantage par l'hydrolyse enzymatique, plus complète et moins brutale.

Les résultats obtenus grâce à cette méthode sont rassemblés au chapitre III, page 106.

CHAPITRE I

LA REACTION AU PENTACHLORURE D'ANTIMOINE

Le pentachlorure d'antimoine avait été utilisé en 1926 pour le dosage du cholestérol (STEINLE et KAHLENBERG [125]) et en 1929 pour la purification des hormones sexuelles GOLDHAMMER [47]. DINGEMANSE, de JONGH, KOBER et LAQUEUR [37] remarquèrent incidemment en 1930 que ce réactif donnait une coloration rouge avec une substance cristalline, isolée par eux, qui n'était autre que le prégnandiol.

Partant de ces observations déjà anciennes, nous avons précisé les possibilités du réactif et ses conditions d'emploi pour le rendre applicable au dosage du prégnandiol urinaire.

Nos constatations sont les suivantes :

Si on mélange une solution chloroformique de prégnandiol et une solution chloroformique de pentachlorure d'antimoine, il se développe une coloration jaune ambrée, puis brune pouvant atteindre une grande intensité (coloration primaire).

L'addition à la solution ainsi colorée d'une petite quantité d'alcool transforme la coloration brune en une coloration verte, moins intense (coloration secondaire).

Cette dernière s'avère beaucoup plus spécifique du prégnandiol que la coloration brune primaire.

Nous indiquons d'abord les données expérimentales nécessaires pour effectuer la réaction ; nous les discutons ensuite.

TECHNIQUE

A) RÉACTIFS NÉCESSAIRES

1 - *Réactif au pentachlorure d'antimoine.*

Le réactif est constitué par une solution à 5 pour 100 en volumes de pentachlorure d'antimoine dans le chloroforme.

Le pentachlorure d'antimoine est un liquide jaune clair, lourd ($Cl.^5 Sb$, P.M. : 297 ; D = 2.31). Il dégage au contact de l'air des vapeurs blanches irritantes. Sa manipulation doit s'effectuer avec de la verrerie parfaitement sèche ; des traces d'humidité provo-

quant un dépôt blanc d'oxychlorure. La verrerie ayant été à son contact sera nettoyée dès que possible à l'acide chlorhydrique concentré. Une coloration jaune excessive indiquerait la présence de chlore libre. Il sera bon dans ce cas d'ajouter au pentachlorure quelques cristaux de trichlorure d'antimoine Cl_3Sb pour le stabiliser. Celui-ci n'intervient pas dans la réaction. Le pentachlorure d'antimoine sera conservé en petites ampoules scellées à l'abri de la lumière.

Le chloroforme employé doit être absolument privé d'alcool qui fausserait la réaction (*). Pour plus de sûreté il sera lavé à trois reprises avec 10 volumes d'eau à chaque fois, desséché par contact avec du chlorure de calcium anhydre, puis distillé en rejetant les produits de tête et de queue.

Le réactif ainsi obtenu doit être limpide, un louche indiquerait des traces d'eau. On peut le conserver assez longtemps en flacons jaunes à la glacière mais son activité diminue légèrement et il est nécessaire de procéder à un nouvel étalonnage. Dans les réactifs de quelques semaines, il apparait un dépôt cristallin de trichlorure d'antimoine qui ne semble pas gênant.

Il est préférable somme toute d'en préparer souvent et peu à la fois.

2 - *Solution de prégnandiol.*

Elle est préparée en dissolvant du prégnandiol cristallisé (P.F. = 236°) dans du chloroforme purifié comme il est dit ci-dessus. La dissolution est assez lente.

3 - *Alcool méthylique absolu.*

Alcool de synthèse à 99°-100°.

B) MODE OPÉRATOIRE.

On mesure dans un tube à essai parfaitement sec, muni d'un bouchon émeri ou de liège fin, 2 cm3 de la solution de prégnandiol dans le chloroforme, puis 2 cm3 de réactif au pentachlorure d'antimoine. Le tube est bouché, agité, puis laissé au repos. La coloration brune « primaire » se développe immédiatement.

(*) Le chloroforme anesthésique du Codex contenant 5 pour 1000 d'alcool, ne peut donc être employé ici

Une heure et quart après environ, on ajoute 0,3 cm3 d'alcool méthylique absolu. Une coloration verte se développe aussitôt, elle atteint son maximum en 20 secondes environ et demeure stable 4 à 5 minutes. Cette coloration peut être observée au colorimètre à cellule photoélectrique en lumière rouge. (Tous nos travaux ont été effectués avec l'électrophotomètre de MEUNIER).

DISCUSSION

I) RÉACTIFS ET COLORATION.

Nous avons réalisé nos premières expériences (juin 1944) avec une solution de pentachlorure d'antimoine à 20 pour 100 ; il est apparu qu'une telle concentration n'était pas nécessaire ; le réactif à 5 pour 100 est beaucoup plus stable et peut être utilisé pendant au moins 48 heures sans nouvel étalonnage.

La coloration « secondaire » verte est donnée par plusieurs alcools ; nous avons utilisé d'abord l'ALCOOL ÉTHYLIQUE absolu. La coloration nous a paru plus intense et plus pure avec l'ALCOOL MÉTHYLIQUE. Le volume utilisé (0,3 cm3) est nécessaire et suffisant. Ce virage semble dû à un phénomène d'oxydation.

La couleur obtenue avec l'alcool méthylique est d'autant plus franche que la concentration en prégnandiol est plus grande. Pour les petites concentrations (prises d'essai de 0,1 mg) elle est jaunâtre et difficilement appréciable.

Les quantités supérieures donnent une coloration verte teintée de jaune variant avec la concentration du vert olive au vert sombre (teintes 307 à 310 du « Code des couleurs » de Séguy [121]).

Elle doit être lue en lumière rouge. Les expériences indiquées ont été effectuées avec le filtre rouge de l'électrophotomètre de Meunier qui permet d'éliminer au maximum les absorptions dues aux colorations parasites (généralement jaunes).

II) ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA RÉACTION.

La coloration « secondaire » verte atteint son maximum au bout de quelques secondes (vingt environ) ; elle demeure stable 4 à 5 minutes, puis décroît lentement. C'est pendant cet intervalle de temps suffisant qu'il faut effectuer la mesure colorimétrique.

La coloration brune « primaire », par contre, s'établit beaucoup plus lentement. Elle n'atteint son intensité maximum qu'au bout d'une heure environ.

L'intensité de la coloration verte varie en fonction de l'intensité de la coloration brune ; il faut donc ajouter l'alcool méthylique lorsque cette dernière a atteint son maximum.

Ces faits ont été établis grâce à deux types d'expériences. Dans l'une, le développement de la coloration brune primaire est suivi au moyen de l'électrophotomètre de Meunier, il faut prendre soin d'éviter l'échauffement du liquide en expérience ce qui pourrait entraîner des modifications (évaporation). Les variations d'intensité de la coloration brune en fonction du temps sont indiquées dans le Tableau n° 12.

Dans l'autre le réactif au pentachlorure d'antimoine est ajouté simultanément à plusieurs tubes contenant la même quantité de prégnandiol. Les réactions ainsi déclenchées au même moment seront « virées » l'une après l'autre à intervalles définis par addition d'alcool méthylique. La coloration verte ainsi obtenue est lue à l'électrophotomètre. On pourra ainsi établir la cinétique de la réaction d'ensemble. (Primaire + secondaire) (voir tableau n° 13).

Conclusion.

La coloration primaire atteint un maximum au bout d'une heure environ et demeure stable au moins une demi-heure. Nous nous sommes fixé un délai d'une heure et quart entre l'addition de pentachlorure d'antimoine et l'addition d'alcool méthylique. Il est évident que ce délai n'est pas absolu et qu'il importe surtout de faire les diverses lectures (milieux à doser et milieux étalons) au bout d'un laps de temps égal.

La coloration secondaire verte s'établit immédiatement et demeure stable 4 à 5 minutes. Nous la lisons avec l'électrophotomètre de Meunier au bout de 4 minutes.

Tableau n° 12

Cinétique de la coloration brune obtenue avec 0,5 mg de prégnandiol :

Temps (en min.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	14
Intensité de la coloration (*)	45	60	68	73	78	82	86	90	94	97	104	108

Temps (en min.)	16	19	25	30	35	40	45	55	57	85	90
Intensité de la coloration (*)	112	120	129	138	145	150	155	166	166	165	165

Tableau n° 13

Cinétique de la réaction obtenue avec 0,5 mg de prégnandiol

Temps (en min.)	30	60	90	105	120	150
Intensité de la coloration (*) secondaire	63	73	72	70	64	47

III) LA COLORATION EST QUANTITATIVE.

De nombreuses expériences d'étalonnage ont établi que la coloration verte « secondaire » varie en fonction linéaire de la concentration du prégnandiol.

La courbe d'étalonnage obtenue à partir du prégnandiol pur sera donc une droite et il suffira d'établir 2 ou 3 points pour la définir. Elle ne peut malheureusement être construite une fois pour toutes : son coefficient angulaire est variable par suite de l'inconstance du réactif antimonié.

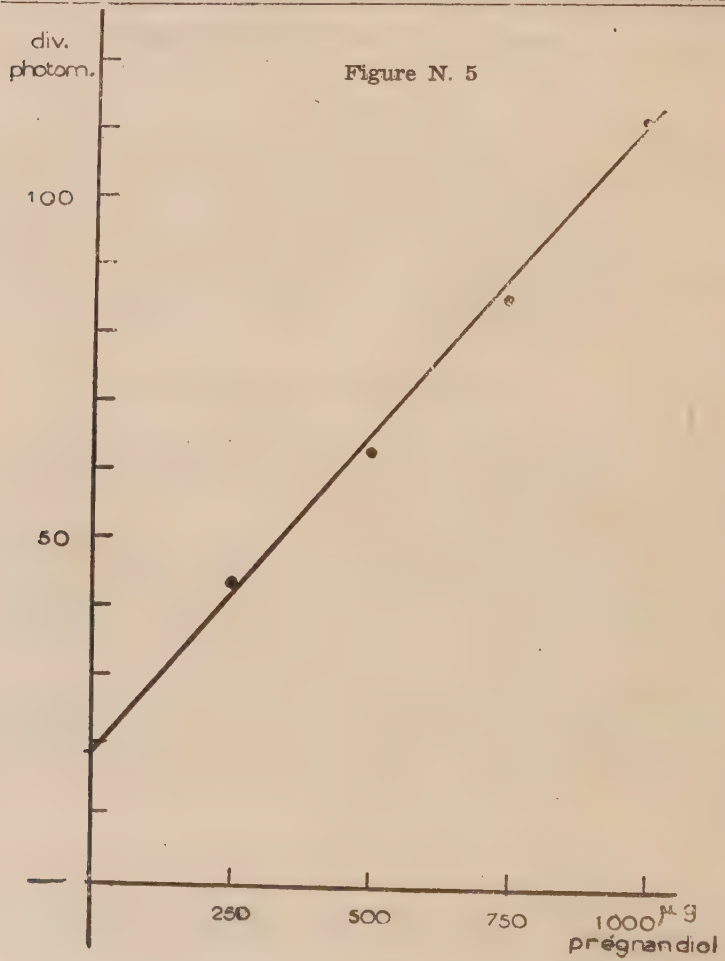
Nous donnons dans le tableau n° 14 et la figure n° 5 le détail et la représentation graphique d'un étalonnage effectué avec une solution chloroformique de prégnandiol pur (1 mg dissous dans 2 cm3).

(*) Les chiffres indiqués correspondent aux divisions du tambour de l'électrophotomètre de Meunier (0,5 mg de prégnandiol correspondant à la prise d'essai d'une réaction).

Tableau n° 14

Prégnandiol	Solution titrée	Chloroforme pur	Absorption
0	0 cm3	2 cm3	19
0,25 mg.	0,5 cm3	1,5 cm3	43
0,50 mg.	1 cm3	1 cm3	62
0,75 mg.	1,5 cm3	0,5 cm3	85
1 mg.	2 cm3	0 cm3	110

Figure N. 5



IV) LIMITE DE LA SENSIBILITÉ.

Nous avons déjà dit que la coloration est indéfinissable pour des prises d'essai inférieures au dixième de milligramme. Il n'y a plus à proprement parler de coloration verte. Nous considérons cette quantité comme la limite inférieure de sensibilité de la réaction.

V) SPÉCIFICITÉ DE LA RÉACTION AU PENTACHLORURE D'ANTIMOINE.

La réaction a été essayée avec un certain nombre de stéroïdes. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant n° 15 (réaction effectuée sur 2 cm3 de solution chloroformique du produit expérimenté avec 2 cm3 de réactif au pentachlorure d'antimoine) (voir fig. n° 6).

Tableau n° 15

Substance	Quantité en réaction	Coloration primaire	Coloration secondaire
Prégnandiol	0,5 mg.	jaune brun	verte
Androstérone	0,25 mg. 0,50 mg. 1 mg.	jaune pâle jaune jaune brun	jaune très pâle jaune très pâle jaune légèrement verdâtre
Cholestérol	0,3 mg. 1,5 mg.	jaune brun brun	gris vert bleu virant au vert bleuâtre intense
Désoxycorticostérone (acétate)	2 mg.	jaune brun	jaune pâle
Folliculine	1 mg.	jaune orangé	jaune
Oestradiol	1,2 mg.	jaune ambré	légèrement rose
Oestradiol-monobenzoate	2 mg.	jaune pâle	presque incolore

Substance	Quantité en réaction	Coloration primaire	Coloration secondaire
Progestérone	3 mg.	jaune pâle	presque incolore
Testostérone	1,6 mg.	jaune pâle	presque incolore
Transdehydro-androstérone	1 mg.	rouge cerise	jaune verdâtre
Acide cholique	1 mg.	rougeâtre	jaune verdâtre
»	3 mg.	rougeâtre	verte
Ergostérol (*)	1 mg.	rouge vermillon	vert jaspe
Fongistérol (*)	1 mg.	rouge sang de bœuf	bleu de Prusse virant au violet
Digitaline codex (**)	1 mg.	jaune brun avec précipité	verdâtre
Strophantine	p. 1 mg. peu soluble	jaune brun	verdâtre

Remarques.

La coloration fournie par le cholestérol après addition d'alcool méthylique est bleue les premières secondes, puis vire au vert, le vert ainsi obtenu contient moins de jaune que le vert obtenu avec le prégnandiol.

(*) Nous remercions Monsieur le Docteur TANRET qui nous a aimablement fourni des échantillons de ces corps.

(**) La quantité de réactif utilisée dans ce cas (2cm3) est trop importante : une combinaison insoluble de la digitaline précipite. Par contre l'emploi d'une moindre quantité de réactif au pentachlorure d'antimoine (1cm3 au plus) donne naissance à une coloration caractéristique : par addition d'alcool métylique (0,3cm3) la *Digitaline* cristallisée donne une belle coloration *bleu roi virant* très lentement au vert. Cette réaction semble due au digitoxigénol qui possède le groupement moléculaire décrit ci-dessus.

Une communication ultérieure sera publiée à ce sujet.

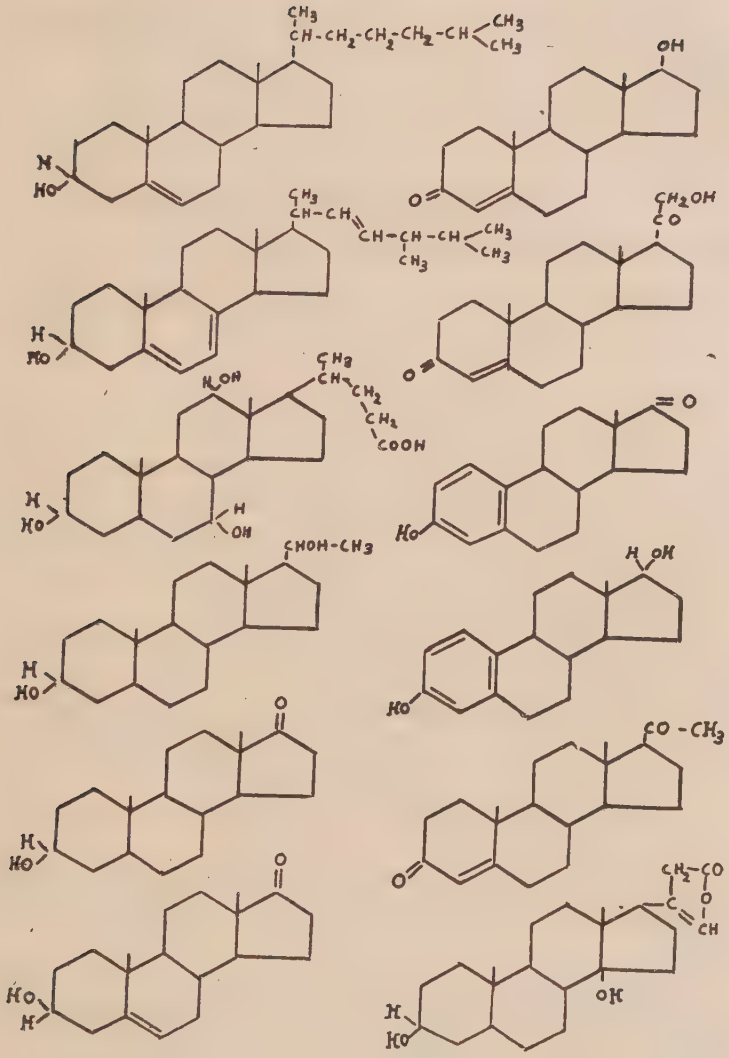


Figure n° 6 - De haut en bas :

Cholestérol.
Ergostérol.
Acide cholique.
Prégnandiol.
Androstérone.
Transdéhydroansdrostérone
Testotérone.
Désoxycorticostérone
Oestrone.
Oestradiol.
Progestérone.
Digitoxigénol.

Les colorations secondaires données par le prégnandiol, l'androstérone, la transdéhydro androstérone, l'acide cholique sont proches les unes des autres sans être absolûment indentiques.

A quantité égale, l'androstérone et la transdéhydroandrostérone donnent une coloration bien moins intense que le prégnandiol.

VI. GROUPEMENT MOLÉCULAIRE EN JEU DANS LA RÉACTION AU PENTACHLORURE D'ANTIMOINE.

L'examen des formules développées des substances expérimentées ci-dessus (voir fig. n° 6) nous conduit à la constatation suivante :

Parmi ces corps, seuls ceux possédant la CYCLE A du noyau stérol SATURÉ avec une FONCTION ALCOOL SECONDAIRE SUR LE CARBONE 3 donnent naissance à une coloration secondaire verte, variant du jaune verdâtre au vert-bleu. C'est le cas du prégnandiol, de l'androstérone et de la transdéhydroandrostérone, du cholestérol et de l'ergostérol, de l'acide cholique, des aglucones de la digitaline et de la strophantine. (Fg n° 7).

Nous n'avons pu pour l'instant, essayer de corps ayant une fonction cetone sur un cycle A saturé.

Par contre les corps possédant un CYCLE A NON SATURÉ, tels que la testostérone, l'œstrone, la désoxycorticostérone, l'œstradiol ne donnent aucune coloration de ce genre.

La position dans l'espace de l'oxhydrile en 3 ne semble pas avoir d'importance.

Nous avons rapproché cette constatation concernant le cycle A des observations de RAOUL et MEUNIER [115] concernant le cycle B.

Ces auteurs utilisent une formule modifiée du réactif de CARR et PRICE (trichlorure d'antimoine en solution chloroformique à saturation additionnée d'anhydride acétique et d'acide sulfurique). Les colorations fournies par ce réactif permettent de caractériser les doubles liaisons du cycle B.

Dans ces conditions le PRÉGNANDIOL qui n'a pas de double liaison ne donne pas de coloration appréciable.

LE CHOLESTÉROL (double liaison en 5,6) donne naissance à une belle coloration lie de vin, puis violette, se développant progressivement. Cette coloration vire ensuite au vert.

La TRANSDÉHYDROANDROSTÉRONE (double liaison en 5,6) donne une coloration rouge sang intense virant au pourpre.

Il est à noter que la PROGESTÉRONE (double liaison en 4,5 dans le cycle A) traitée par le réactif de RAOUL et MEUNIER donne lieu à l'apparition d'une fluorescence verte (apparence d'une solution diluée de fluorescéine).

D'autre part, le prégnandiol ne donne aucune coloration par la réaction de CARR et PRICE proprement dite.

Ainsi les deux chlorures d'antimoine paraissent avoir chacun leur spécificité propre.

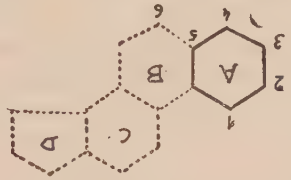


Figure n° 7

Nous examinons plus loin (voir p. 109) les conséquences à en tirer pour le dosage colorimétrique du prégnandiol ; nous verrons que dans les conditions où elle est pratiquée, la réaction possède une spécificité suffisante pour permettre le dosage du prégnandiol urinaire.

CHAPITRE II

METHODE DE DOSAGE DU PREGNANDIOL TOTAL

TECHNIQUE

MATÉRIEL :

En plus de la verrerie courante il sera nécessaire d'avoir :

1.) Un ballon de deux ou trois litres muni d'un réfrigérant à reflux à ouverture supérieure élargie si possible. Ce ballon sera utilisé pour l'hydrolyse.

2) Un appareil à extraction continue par un solvant plus léger que l'eau. Nous avons utilisé l'appareil mis au point par J. CHEYMOL et R. HENRY [27].

3.) Un appareil distillatoire pouvant fonctionner sous vide, chauffé par un bain-marie électrique.

4.) Un agitateur mécanique.

5.) Un colorimètre à cellules photoélectriques. Nous avons employé l'électrophotomètre de Meunier avec une cuve de 1cm x 1 cm.

RÉACTIFS.

— Acide chlorhydrique pur (incolore) D = 1,17).

— Ether, toluène, alcool à 95°, chloroforme exempt d'alcool (voir p. 85).

— Solution à 5 pour 100 de soude dans l'alcool méthylique (préparée au mortier avec de la soude pure à l'alcool, et de l'alcool méthylique absolu à 99° - 100°. Réactif filtré de temps à autre pour éliminer le carbonate de sodium insoluble qui se forme au contact de l'air).

— Acticarbone qualité L. V. S.

— Solution titrée de prégnandiol dans le chloroforme, préparée avec du prégnandiol pur (P.F. 236°) et du chloroforme exempt d'alcool, (par exemple 1 cm^3 = 0,5 mg. de prégnandiol).

— Réactif au pentachlorure d'antimoine (voir p. 85).

— Alcool méthylique à 99° - 100°.

MODE OPÉRATOIRE.

L'urine est recueillie en présence d'un antiseptique (par exemple : cyanure de mercure à 0,5 g. pour 1.000 d'urine).

Le volume d'urine nécessaire pour un dosage est fonction de la quantité supposée de prégnandiol. 200 ou 300 cm^3 sont suffisants pour une urine de femme enceinte ; un litre pour une urine recueillie au cours du cycle menstruel.

1 - *Hydrolyse.*

L'urine mesurée, est versée dans le ballon de deux litres, additionnée de 50 cm^3 de toluène et portée à ébullition sous réfrigérant à reflux. Quand l'ébullition commence, on ajoute à travers le réfrigérant, par petites fractions, 10 pour 100 du volume d'acide chlorhydrique concentré. L'ébullition est maintenue 15 minutes, puis le ballon est refroidi par immersion dans l'eau froide, sans secousses, pour ne pas déclancher d'ébullition tumultueuse.

2 - *Extraction.*

L'urine hydrolysée, refroidie, de couleur brune et le toluène surnageant, sont versés dans le ballon laboratoire de l'appareil à extraction continue. Celui-ci est garni d'éther (150 cm^3 environ dans le ballon générateur de l'appareil de CHEYMOL et HENRY.) L'extraction est mise en route et poursuivie pendant deux heures. Il se produit généralement au bout d'une vingtaine de minutes une phase émulsionnée. On s'en débarrassera en filtrant alors toute la liqueur sous vide léger.

L'extrait éthéré obtenu est coloré en rouge acajou. On décante, s'il est nécessaire, la phase aqueuse qui aurait été entraînée : on peut agiter l'éther avec un peu de sulfate de sodium anhydre pour achever de le déshydrater.

3 - *Purification alcaline.*

L'éther extractif est versé dans un ballon de 1 litre, bien sec, pouvant s'adapter à un appareil de distillation sous vide. L'éther une fois distillé, il reste le toluène. Celui-ci est amené avec du toluène neuf à un volume d'au moins 100 cm^3. Le ballon est chauffé à nouveau et adapté quelques instants au dispositif distillatoire sous vide pour chasser les traces d'eau.

On ajoute alors dans le toluène chaud 20 cm^3 de solution méthylique de soude à 5 pour 100, on agite et on chauffe au bain-marie.

L'alcool méthylique bout et un précipité brun se forme. Lorsque l'ébullition de l'alcool méthylique se termine, on adapte le ballon au dispositif distillatoire sous vide pour chasser les derniers restes de ce réactif. On distille quelques minutes en prenant garde que le volume initial ne soit pas diminué de plus de moitié.

Le ballon est alors retiré du bain-marie et abandonné à la température du laboratoire jusqu'à refroidissement. L'extrait toluènique est filtré sous vide léger ; on lave à plusieurs reprises le ballon et le précipité restant sur le filtre avec du toluène frais. Le filtrat doit être limpide et coloré en jaune pâle. Il est évaporé à sec sous vide en évitant les surchauffes du résidu.

4 - *Purification par adsorption.*

Ce résidu est repris par 100 cm^3 d'alcool à 95°, transvasé dans un Erlenmeyer et additionné de 1 gr. d'acticarbone L.V.S. La fiole d'Erlenmeyer est bouchée et agitée trente minutes au moins dans l'agitateur mécanique. On filtre, fiole d'Erlenmeyer et filtre sont lavés à l'alcool. Le filtrat alcoolique doit être incolore. Il est évaporé à sec sous pression réduite. Les dernières traces d'alcool sont soigneusement chassées par un courant d'air, en évitant toute surchauffe du résidu.

Le résidu ainsi obtenu est enfin repris par du chloroforme exempt d'alcool, dans une fiole jaugée de 10 cm^3 - 20 cm^3 au plus, de manière que la solution chloroformique, ainsi obtenue, limpide et incolore, contienne 0,2 à 2mg. de prégnandiol par cm^3.

5 - *Dosage colorimétrique* (*voir p.* 86)

Une quantité aliquote de cette solution chloroformique est mesurée dans un tube à essai. Le volume est complété à 2cm^3, si besoin est, avec du chloroforme. On prépare en même temps une gamme d'étalonnage composée par exemple de trois tubes contenant 1cm^3, 1,5 cm^3, 2cm^3 de solution titrée de prégnandiol dans le chloroforme ; ils contiennent ainsi respectivement par exemple 0,5 mg., 0,75 mg., et 1 mg. de prégnandiol.

On ajoute alors dans tous ces tubes 2 cm^3 de réactif au pentachlorure d'antimoine, on bouche et on agite.

Au bout d'une heure et quart environ on ajoute à chaque tube 0,3 cm^3 d'alcool méthylique absolu. On mélange et on verse le tout dans la cuve photométrique. L'intensité de la coloration verte est mesurée à l'électrophotomètre (filtre rouge) au bout de 4 minutes.

Les 3 absorptions mesurées par les tubes étalons permettront de construire la droite d'étalonnage. On rapportera à cette courbe l'absorption due à l'extrait urinaire, ce qui fournira la quantité de prégnandiol dans la prise d'essai. Il restera à calculer la quantité correspondante à l'urine des 24 heures.

EXEMPLE : Volume de 24 heures ..... 1,5 litre

Prise d'essai ..... 1,0 litre

Volume de l'extrait chloroformique final : 10 cm^3

La réaction colorée est effectuée sur 1 cm^3 de cet extrait chloroformique. Le chiffre "68" lu sur le tambour du photomètre correspond sur la courbe d'étalonnage à 0,55 mg.

On en déduira :

Prégnandiol par litre : 0,55 x 10 = 5,5 mg.

Prégnandiol par 24 heures: 5,5 x 1.500 : 1.000 = 8,25 mg.

REMARQUE.

Dans le cas où l'ordre de grandeur de la prégnandiolurie est inconnu, il sera nécessaire au préalable de faire une réaction colorée approchée pour déterminer l'importance de la coloration. On établira en conséquence la courbe d'étalonnage et les prises d'essai d'extrait chloroformique.

DISCUSSION

HYDROLYSE et EXTRACTION.

L'hydrolyse représente la phase la plus incertaine de la méthode. Nous estimons que les écarts constatés dans le rendement d'ensemble proviennent de ce stade initial.

Après divers essais nous nous sommes ralliés aux conclusions formulées par ASTWOOD et JONES [5] : temps d'ébullition 15 minutes, 10 pour 100 d'acide chlorhydrique, en présence de toluène qui dissout le prégnandiol libéré. Selon les courbes publiées par ces auteurs, le rendement dans les meilleures conditions ne dépasse pas 80 pour 100. Nous avons au cours de plusieurs essais obtenu des rendements supérieurs dus probablement à l'emploi d'un appareil à extraction continue (appareil de J. CHEYMOL et R. HENRY [27]). Nous avions essayé en particulier de réaliser, grâce à cet appareil l'hydrolyse et l'extraction simultanée, le ballon laboratoire pouvant être chauffé.

Un premier essai fut réalisé avec du benzène et 10 pour 100 de Cl H ; la température du ballon laboratoire fut maintenue deux heures à 70°. La quantité extraite de prégnandiol libre représentait 66 pour 100 du prégnandiol initial (qui était à l'état de glucuronide). Le rendement médiocre fut attribué à l'insuffisance de la température atteinte, température qui ne pouvait être dépassée, car le benzène serait entré en ébullition.

Un second essai fut donc réalisé dans les mêmes conditions avec du toluène. La température du ballon laboratoire fut portée à 80° ; le rendement fut encore de 66 pour 100. La vitesse de circulation du toluène dans l'appareil était beaucoup plus faible que pour le benzène et l'éther, du fait de son point d'ébullition élevé (P.E. = 110°) obligeant d'ailleurs à chauffer au bain d'huile le ballon générateur ; nous avons donc décidé d'hydrolyser l'urine au préalable, comme il est dit ci-dessus, puis d'extraire par l'éther le prégnandiol libéré.

Dans ces conditions, l'appareil d'extraction de J. CHEYMOL et R. HENRY, donne d'excellents résultats. Le débit de l'éther est important, (1 litre par heure environ), l'extraction rapide et complète. L'expérience montre que 50 pour 100 du prégnandiol présent est enlevé dans le premier quart d'heure, plus de 80 pour 100

en trois quarts d'heure, 90 pour 100 en une heure ; la presque totalité à la fin de la deuxième heure. Rappelons que le prégnandiol libre est pratiquement insoluble dans l'eau et d'une solubilité moyenne dans l'éther (voir p. 9).

Nous donnons ci-dessous (tableau n° 16) les résultats obtenus par hydrolyse suivie d'extraction à l'éther à partir d'une solution pure de prégnandiolglucuronate de sodium dans l'eau. On voit que dans deux cas le rendement est bon, dans le troisième il est beaucoup plus faible, sans raison apparente.

Tableau n° 16

	Prégnandiol-glucuronate de sodium dissous (en prégnandiol)	Prégnandiol libéré extrait	Rendement pour 100
Epérience n° 1	29 mg.	25,6	87
Epérience n° 2	18 mg.	16	88
Epérience n° 3	30 mg.	19,9	66

Temps d'ébullition : 15 minutes.
Acidité : 10 pour 100.
Temps d'extraction : 2 heures.

REMARQUES.

1°) La présence de toluène au cours de l'hydrolyse améliore le rendement de 5 à 10 pour 100.

2°) L'eau qui aurait été entraînée sera séparée par décantation de l'extrait éthéré, il est bon d'agiter celui-ci avec un peu de sulfate de sodium anhydre pour achever de le déshydrater ; ce sulfate de sodium sera lavé à l'éther pour éviter toute perte de prégnandiol.

PURIFICATION DE L'EXTRAIT.

L'extrait ainsi obtenu, en milieu acide, est fortement coloré en rouge acajou. Cette coloration est due à la transformation des

pigments au cours de l'hydrolyse en indirubine. Les impuretés colorées qui en sont la cause seront éliminées au cours de deux opérations : la purification alcaline et la purification par le charbon activé.

PURIFICATION ALCALINE.

Elle a pour but d'éliminer les substances possédant des fonctions phénol ou acide.

Nous avons utilisé le procédé décrit par ASTWOOD et JONES (soude dans l'alcool méthylique) [5]. Il n'entraîne pratiquement aucune perte de prégnandiol et ne provoque pas d'émulsions. Ces deux qualités essentielles ne se retrouvent pas dans la purification par lavage avec des solutions aqueuses de soude.

Après quelques tâtonnements, nous avons utilisé une solution méthylique de soude plus concentrée que celle employée par ASTWOOD et JONES, et en quantité plus grande : 20 cm3 de soude à 5 pour 100 dans l'alcool méthylique, au lieu de 10 cm3 à 2 pour 100. Cet apport supplémentaire de soude précipite le maximum d'impuretés, il n'a jamais été nécessaire de recommencer l'opération comme on est quelquefois obligé de le faire avec les quantités indiquées par ASTWOOD.

La combinaison alcaline des impuretés est quelquefois goudronneuse et non solide. Il faut alors décanter, laver le résidu avec du toluène, décanter à nouveau.

Le filtrat ainsi obtenu est coloré en jaune pâle, il est parfois presque incolore. Les pertes au cours de cette opération sont nulles. Le fait est établi par les auteurs qui n'ont jamais récupéré de prégnandiol du précipité.

Nos essais personnels ont donné des résultats identiques :

5 mg. de prégnandiol sont dissous dans 50 cm3 de toluène, puis traités par 20 cm3 de soude méthylique à 5 pour 100, selon la technique indiquée. Le filtrat toluénique est évaporé, repris par l'alcool, évaporé à sec et pesé.

Une opération témoin identique est effectuée sur 50 cm3 de toluène ne contenant pas de prégnandiol.

Les résultats sont indiqués dans le tableau n° 17.

On voit que le rendement est remarquable.

Tableau n° 17

	Prégnandiol dissous	Poids du résidu sec	Poids attribué au prégnandiol	Rendement pour 100
Expérience n° 1	5 mg.	6,5 mg.	6,5 — 1,4 =	102
témoin	0	1,4 mg.	5,1 mg.	
Expérience n° 2	6 mg.	7,2 mg.	7,2 — 1,3 =	98
témoin	0	1,3 mg.	5,9 mg.	

ADSORPTION PAR LE CHARBON ACTIVÉ.

Le filtrat toluénique ainsi obtenu doit subir une seconde purification. Il contient encore des impuretés pouvant réagir avec le pentachlorure d'antimoine. Le traitement au charbon activé permet de les éliminer et d'obtenir une solution incolore. L'opération se fait sans perdre de prégnandiol si elle est pratiquée dans les conditions indiquées plus haut.

Il est indispensable d'opérer en phase alcoolique, avec le noir indiqué (*acticarbone L.V.S.*).

Des essais en phase toluènique, ce qui aurait supprimé une manipulation, ont été infructueux, les rendements étant inconstants.

L'emploi d'une autre variété de charbon (acticarbone H.C.) a provoqué des pertes de prégnandiol.

Par contre, l'adsorption en milieu alcoolique (alcool à 95°) par l'acticarbone L.V.S. (1 gr. pour 100 cm3 d'alcool) donne de bons résultats : décoloration complète, rendement voisin de 100 pour 100. C'est ce qui apparaît des résultats indiqués dans le tableau n° 18.

Ces valeurs ont été obtenues en dissolvant du prégnandiol pur dans 50 cm3 d'alcool à 95° ; la solution additionnée de 0,50 g. d'acticarbone est agitée pendant une demi-heure, filtrée, évaporée à sec. Le résidu est pesé. Une expérience témoin identique est réalisée sans prégnandiol pour déterminer le poids du résidu attribuable à l'alcool et au charbon.

La différence des poids des deux résidus (poids corrigé) représente le prégnandiol.

Les résultats sont indiqués dans le tableau n° 18.

Solvant	Acti-carbone	Prégnan-diol dissous	Poids du résidu	Poids corrigé	Rendement pour 100
Alcool à 95°	L.V.S.	5 mg.	5,3 mg.	4,6 mg.	92
Alcool à 95°	L.V.S.	5 mg.	6,1 mg.	5,1 mg.	102
Alcool à 95°	L.V.S.	5 mg.	7,3 mg.	4,9 mg.	98
Alcool à 95°	L.V.S.	5 mg.	7 mg.	4,9 mg.	98
Toluène	L.V.S.	6 mg.	5,9 mg.		98
Toluène	L.V.S.	5 mg.	1,6 mg.		32
Toluène	L.V.S.	5 mg.	2,3 mg.		46
Alcool à 95°	H.C.	5 mg.	2 mg.		40
Toluène	H.C.	5 mg.	3,1 mg.		62

RÉACTION COLORÉE ET SENSIBILITÉ.

La réaction au pentachlorure d'antimoine s'effectue sans difficultés particulières sur l'extrait chloformique final.

L'examen des urines masculines dépourvues de prégnandiol montre qu'après addition d'alcool méthylique (coloration secondaire) il persiste toujours une légère teinte jaune, d'intensité peu supérieure d'ailleurs à celle donnée par le simple mélange des réactifs (chloroforme et solution de pentachlorure d'antimoine). Le filtre rouge de l'électrophotomètre de Meunier que nous avons employé ne permet pas de l'éliminer complètement. Une coloration identique a été observée avec les urines féminines de la première phase du cycle menstruel.

Cette coloration « de fond », évaluée en prégnandiol par les cellules photoélectriques de l'appareil représente une erreur ne dépassant qu'exceptionnellement 1 mg. par litre d'urine. Cette quantité nous paraît représenter la limite de la sensibilité de la méthode avec l'appareillage indiqué.

Elle pourrait probablement être abaissée par l'emploi de procédés spectrographiques qui assureraient une meilleure spécificité.

Il est possible aussi que cette coloration de fond soit due à des substances telles que l'androstérone.

RENDEMENT GÉNÉRAL DE LA MÉTHODE.

Nous avons calculé le rendement de la technique sur des urines masculines additionnées d'une quantité connue de prégnandiol glucuronate de sodium. L'urine employée était un mélange d'urines d'hommes en bonne santé. Il avait été vérifié que ce mélange ne contenant pas de prégnandiol.

Les résultats obtenus consignés dans le tableau n° 19 montrent d'assez grandes variations dans le rendement qui varie de 65 à 102 pour 100.

Il ressort des paragraphes précédents que les pertes proviennent pour la majeure partie de l'hydrolyse acide et qu'on ne peut guère espérer un rendement réel supérieur à 80 pour 100. Le rendement de l'hydrolyse d'autre part est assez inconstant, ce qui rejaillira sur le rendement de l'ensemble.

Le rendement élevé indiqué ci-dessous (tableau n° 19) (102 pour 100) est probablement dû à une coloration parasite, comptée comme prégnandiol par l'électrophotomètre. Ces teintes de fond ont moins d'importance relative pour les colorations intenses que pour les colorations faibles, obtenues avec davantage d'extrait urinaire. Ceci explique que le rendement apparent est d'autant plus élevé que la concentration est plus faible.

Tableau n° 19

	Quantité de prégnandiol glucuronide dissoute (exprimée en prégnandiol)	Quantité dosée	Rendement pour 100
Expérience n° 1	3,6 mg.	3,7 mg.	102
Expérience n° 2	4,7 mg.	4,2 mg.	89
Expérience n° 3	9,2 mg.	6 mg.	65
Expérience n° 4	18 mg.	12,8 mg.	71

Le rendement moyen de la méthode s'établira donc entre 75 et 80 pour 100. Chiffres nettement comparables aux méthodes étudiées précédemment.

CHAPITRE III

RESULTATS CLINIQUES OBTENUS AVEC LA METHODE

Les circonstances ne nous ont pas permis d'appliquer la méthode proposée à des cas aussi nombreux que nous l'aurions souhaité. Néanmoins nous avons pu pratiquer une trentaine de dosages sur des urines d'origines diverses.

Les résultats obtenus concordent dans l'ensemble avec l'opinion générale. Nous les résumons ci-après :

I.) URINES MASCULINES.

La méthode ne décèle pas de prégnandiol dans l'urine masculine. Les colorations obtenues par la réaction au pentachlorure d'antimoine sont jaunâtres, pâles, légèrement supérieures en général à la coloration fournie par les réactifs seuls. Nous n'avons jamais observé la coloration verte caractéristique du prégnandiol.

Ces colorations jaunes mesurées à l'électrophotomètre de Meunier peuvent être exprimées en prégnandiol par 24 heures, elles représenteraient ainsi des quantités variant entre 0,5 et 1,5 mg. par 24 heures, sans signification réelle.

II.) URINES DE FEMME ENCEINTE.

Nous avons vu que la plupart des méthodes donnent alors des résultats valables. Nous avons effectué quelques dosages sur des urines de femme enceinte, comparativement avec la méthode de VENNING appliquée au même échantillon.

Les résultats obtenus de la sorte sont du même ordre, avec quelques différences en plus ou en moins. Ces différences peuvent être attribuées aux erreurs par excès de la méthode de

VENNING (pesée d'impuretés), ou aux erreurs par défaut dues à la présence de prégnandiol libre, non dosé par cette technique.

Ces résultats sont résumés dans le tableau n° 20.

D'autre part nous avons pu effectuer avec notre technique un dosage au début de la gravidité (9 jours après la date présumée de la menstruation absente, soit une vingtaine de jours après la fécondation). Nous avons pu observer l'apparition d'une coloration franchement verte correspondant à 7,1 mg. de prégnandiol. Ce diagnostic « chimique » de la grossesse (présence nette de prégnandiol avec absence des règles) a été confirmé cliniquement par la suite.

Tableau n° 20

Expérience	Age de la grossesse	Méthode VENNING	Méthode proposée
N° 1	4e mois	8,2 mg.	11,2 mg.
N° 2	4e mois	16 mg.	15,4 mg.
N° 3	9e mois	25 mg.	42 mg.
N° 4	9e mois	44 mg.	33,2 mg.
N° 5		9,8 mg.	10,4 mg.

Les urines n° 1 et n° 2 proviennent d'une même femme ; les urines n° 3, n° 4 et n°5 d'une autre. L'urine n° 5 représente l'élimination du prégnandiol dans les 48 heures suivant l'accouchement.

III.) URINES DU CYCLE MENSTRUEL.

Les dosages effectués, trop peu nombreux pour en tirer des conclusions définitives, fournissent cependant certaines indications.

10 dosages ont été pratiqués au cours de deux cycles consécutifs. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau n° 21.

Les deux cycles ont duré 29 jours chacun. L'intervalle entre les règles dans les deux cas est de 23 jours. 6 dosages ont été faits au cours du premier cycle, 4 au cours du second.

Le prégnandiol n'apparaît que dans les dix derniers jours de chaque cycle. Les réactions au pentachlorure d'antimoine terminant les dosages pratiqués au début du cycle donnent naissance à

des colorations jaunes pâles, en tous points comparables à celles fournies par les urines masculines ; mesurées à l'électrophotomètre ces colorations peuvent être exprimées en prégnandiol (voir tableau n° 21) mais les valeurs ainsi obtenues sont sans signification réelle.

Les colorations observées avec les urines des 10 derniers jours du cyclé possèdent la teinte vert olive caractéristique du prégnandiol ; elles correspondent à des quantités assez importantes de prégnandiol (7 à 11 mg.), supérieures aux quantités généralement obtenues par la méthode de VENNING. Par contre elles sont à rapprocher des valeurs obtenues par M. JAYLE [73].

Si on place l'ovulation au 14e jour avant la menstruation [143] on voit que l'élimination du prégnandiol dans l'urine correspond à la formation du corps jaune avec peut-être un certain décalage : il faut probablement qu'une quantité suffisante de progestérone ait été accumulée dans le sang pour que le prégnandiol apparaisse dans l'urine. On sait que le corps jaune atteint son plus grand développement 5 jours avant la menstruation ; c'est aux alentours de cette date que l'élimination du prégnandiol est la plus importante.

Un dosage effectué sur de l'urine prélevée au milieu de la période hémorragique menstruelle s'est terminé par l'apparition d'une coloration jaunâtre, sans trace de vert, qu'on ne peut attribuer au prégnandiol (voir tableau n° 21 et figure n° 8).

Tableau n° 21

Jours du cycle après le début des règles	10e	12e	17e	19e	24e	27e	29e
Prégnandiol	0,24	1 mg.	1,2	1 mg.	9 mg.	7,7	apparition
Coloration	jaune	jaune	jaune	jaune	vert	vert	des règles

Jours du cycle après le début des règles	3e	10e	15e	21e	27e	29e
Prégnandiol	règles	1,3	1,9	11,6	7,3	apparition
Coloration	jaune	jaune	jaune	vert	vert	des règles

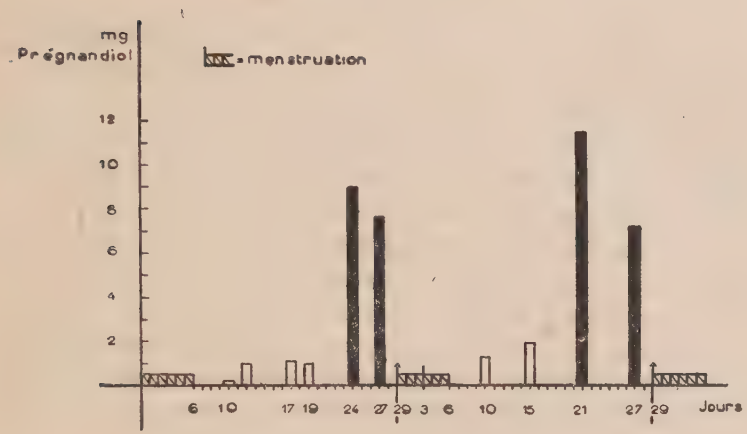


Figure n° 8

Elimination au cours du cycle menstruel.

SUBSTANCES PRESENTES DANS LES URINES NORMALES OU PATHOLOGIQUES POUVANT INTERFERER AVEC LE PREGNANDIOL

Nous avons vu que la spécificité de la réaction au pentachlorure d'antimoine dépend de la conformation du cycle A du noyau stérol (voir p. 94).

Quelques réserves doivent être formulées vis-à-vis des substances pouvant interférer.

1°) ANDROSTÉRONE ET TRANSDEHYDROANDROSTÉRONE.

L'androstérone et la transdéhydroandrostérone donnent avec le réactif au pentachlorure d'antimoine une coloration verte, bien moins intense à quantité égale que celle donnée par le prégnandiol.

L'urine de femme présente un pouvoir androgène évalué à quelques milligrammes par 24 heures par dosage physiologique sur la crête du chapon. Il n'est d'ailleurs pas certain que tout ou partie de cette activité soit due à l'androstérone ; nous avons vu qu'un dérivé de l'alloprégnane, l'épiallopréghanolone, présent dans l'urine de femme, exerce une telle action (voir p. 16).

Cependant nous n'avons jamais observé, au cours des essais effectués sur des urines non pathologiques masculines ou féminines, de troubles dûs à la présence de l'androstérone. De ce fait, nous n'avons pas envisagé l'addition d'une purification supplémentaire par le réactif T. de Girard et Sandulesco. Cette opération éliminerait de façon absolue ces hormones à caractère cétonique.

2°) CHOLESTÉROL.

Le cholestérol donne une coloration bleu-vert avec le réactif au pentachlorure d'antimoine. Sa présence dans l'extrait chloroformique final entraînerait des erreurs. Elle peut être vérifiée en pratiquant la réaction de Liebermann sur une fraction aliquote de cet extrait chloroformique. Si cette réaction est positive, le cholestérol devra être éliminé en le combinant au digitonoside suivant des techniques inspirées de celles du dosage du cholestérol sanguin libre et estérifié.

Bien que l'on ait trouvé de petites quantités de cholestérol (2 à 4 mg.) dans certaines urines [84], nous n'avons jamais été gênés par ce fait et la réaction de Liebermann sur l'extrait, dans des cas suspects (urines ictériques) a toujours été négative.

3°) URINES ICTÉRIQUES.

Les urines ictériques peuvent contenir de grandes quantités de pigments biliaires.

Ces substances ne semblent pas gênantes. C'est ce qui ressort des quelques essais effectués.

Un dosage réalisé dans l'urine d'un homme ictérique en période de défervescence, urinant de faibles quantités (500 cm3) d'une urine très concentrée et très pigmentée (couleur brun sombre, 5 cm3 = 135 gouttes au compte-gouttes de Duclaux), s'est terminé par un résultat nul (absence de coloration verte).

2 essais ont été faits pour décider si les acides biliaires, qui

donnent la réaction au pentachlorure d'antimoine, sont une cause d'erreur du dosage :

Des urines d'hommes non ictérique (5 cm3 = 110 gouttes au compte gouttes de Duclaux) ont été additionnées de 20 mg. d'acide cholique dans une première expérience, 200 mg. d'acide cholique par litre dans une seconde (à l'état de cholate de sodium). Cette quantité représenterait un maximum possible. Dans ces deux cas, le dosage s'est terminé par un résultat nul (absence de coloration verte). Les acides biliaires sont éliminés au cours des purifications ; probablement lors de la purification alcaline.

4°) URINES DE MALADES PRÉSENTANT DES TROUBLES DU CORTEX SURRÉNAL.

Dans l'état actuel de la question notre méthode de dosage du prégnandiol n'est applicable qu'avec des réserves aux urines de cette catégorie, la coloration obtenue en effet n'est certainement pas due uniquement au prégnandiol.

Les essais ont porté sur des urines provenant de deux femmes atteintes de tumeurs de la surrénale. La réaction au pentachlorure d'antimoine effectuée sur des extraits urinaires s'est traduite dans les deux cas par l'apparition de colorations extrêmement intenses, brun rouge foncé pour la coloration primaire, vert brunâtre pour la coloration secondaire.

La lecture colorimétrique oblige alors d'user de dilutions considérables car les colorations sont quelques centaines de fois plus intenses que celles obtenues habituellement avec le prégnandiol.

Ces colorations ne sont pas dues au cholestérol car elles se retrouvent à peu près intégralement sur les extraits traités par le digitonoside ; la réaction de Liebermann d'autre part donne naissance à une coloration jaune orangée.

Il s'agit d'un mélange de stéroïdes. Le pouvoir androgène des extraits est légèrement augmenté ; le pouvoir oestrogène reste normal (*).

(*) Une publication ultérieure précisera certaines de ces indications.

QUATRIEME PARTIE

ETUDE PHYSIOLOGIQUE DU PREGNANDIOL

ETUDE PHYSIOLOGIQUE

DU PREGNANDIOL

Les divers procédés de dosage décrits dans les chapitres précédents et surtout la méthode de VENNING, ont fourni un ensemble de résultats (*) suffisamment cohérents pour étudier le métabolisme et la signification clinique du prégnandiol.

Pour des raisons de commodité, nous groupons dans le chapitre I les divers travaux consacrés à l'élimination urinaire du prégnandiol. Les connaissances ainsi acquises permettent déjà d'importantes conclusions sur son origine naturelle.

Dans le chapitre II nous groupons les travaux expliquant plus spécialement le mécanisme de cette élimination, les diverses origines possibles du prégnandiol et le chemin suivi dans l'organisme.

Nous apportons au cours de ces deux chapitres quelques contributions personnelles aux questions soulevées.

Inactivité physiologique du prégnandiol.

Le prégnandiol ne semble posséder aucune activité physiologique. Ce fait est établi dès 1929 par MARRIAN [104].

Il n'exerce en effet aucune action biologique sur les muqueuses utérines ou vaginales, même à forte dose (70 mg.) ALLEN [2], BUTENANDT [16] FRANK et SOBOTKA [45].

Il se présente donc comme une substance d'élimination, déchet du métabolisme.

(*) Sauf indication contraire, tous les résultats indiqués dans ces deux chapitres l'ont été avec la méthode gravimètrique de VENNING, notre technique personnelle n'ayant été que récemment mise au point.

ROBEY, dans sa thèse (117) a repris la question en injectant le prégnandiolglucuronate de sodium à divers animaux de laboratoire.

L'action progestinogène est recherchée sur la lapine castrée ;
» androgène » » sur les rats et coqs castrés
» oestrogène » » sur les rates castrées.
» gonadotrope » » sur les rats et les souris mâles impubères et sur les lapines impubères

Dans tous ces cas, ROBEY n'a observé aucun modification physiologique. Cependant, une légère action oestrogène sur les rates castrées, est probablement attribuable à des impuretés accompagnant le prégnandiol utilisé. D'autre part, l'auteur a également signalé une action gonadostimulante se traduisant par une élévation de poids du testicule chez le rat impubère, et seulement chez cet animal.

CHAPITRE I

ELIMINATION URINAIRE

Le prégnandiol apparaît essentiellement dans l'urine de la femme pendant les périodes de fonctionnement du corps jaune. Dépourvu d'activité physiologique il y constitue principalement la forme d'élimination et de dégradation de la progestérone, hormone lutéale.

La femme l'élimine au cours de la deuxième partie du cycle menstruel. Commencée peu de temps après l'ovulation, la production atteint son maximum du 20e au 26e jour du cycle et redevient pratiquement nulle de l'apparition des règles à l'ovulation suivante. Les quantités ainsi obtenues demeurent faibles et de mesure délicate dans l'état actuel des techniques (5 à 10 mg. au maximum par 24 heures).

S'il y a eu fécondation, ces quantités se maintiennent et augmentent parallèlement à la persistance du corps jaune : moyen possible de diagnostic de la grossesse. A partir du 4e mois, le placenta produit à son tour de la progestérone et se substitue au corps jaune qui peu à peu régresse. La prégnandiolurie devient considérable atteignant 80 mg par jour et plus au 8e mois, avec de fortes variations d'un jour à l'autre.

L'élimination se ralentit un peu aux approches du terme pour tomber brusquement au moment du travail. Deux ou trois jours après l'accouchement elle est redevenue sensiblement nulle.

Les variations pathologiques sont également intéressantes et caractéristiques du fonctionnement lutéal.

Enfin le prégnandiol sous sa forme libre et des substances voisines ont été isolés de l'urine de plusieurs espèces animales.

Les travaux récents de HOFFMANN et LAM [67] qui ont pu doser directement des quantités minimes de progestérone dans le sang, le corps jaune ou le placenta confirment les indications fournies par le dosage du prégnandiol :

Le corps jaune du début de la grossesse contient davantage de progestérone que le corps jaune du cycle menstruel. Le taux reste élevé jusqu'au 6e mois pour baisser considérablement avant le début de l'accouchement. La progestérone aurait donc une action inhibitrice sur le muscle utérin (*).

I.— LE PREGNANDIOL EN DEHORS DU CYCLE MENSTRUEL ET DE LA GESTATION

a) CHEZ L'HOMME.

Aucun auteur à notre connaissance n'a signalé la présence du prégnandiol dans l'urine masculine (**).

La méthode qualitative de GUTERMAN [48] a donné à cet auteur des résultats négatifs dans deux cas de tumeurs testiculaires, dont l'un correspondait à une réaction de FRIEDMAN positive.

Cependant l'homme est capable de métaboliser la progestérone qui lui est injectée, c'est ce qui résulte des expériences de BUXTON ET WESTPHAL [25].

Ceux-ci injectant 30 mg. de progestérone à deux hommes addisonniens et à un homme normal trouvent dans les urines des quantités quotidiennes de prégnandiol de 1 à 8 mg, et même une fois, 20 mg. Ces hommes n'éliminent pas de prégnandiol en dehors des périodes de traitement.

TRAVAUX PERSONNELS

Nous avons plusieurs fois appliqué diverses méthodes de dosage du prégnandiol à des urines masculines utilisées comme « témoins ».

Ces urines provenaient d'un ou plusieurs individus sains ; quelques cas anormaux ont été également étudiés.

Nous n'avons jamais mis en évidence de prégnandiol.

(*) Sur le corps jaune voir l'ouvrage général de SIMONNET et ROBEY [122].

(**) En cours d'impression nous apprenons que WESTPHAL [147 bis] a pu mettre en évidence de petites quantités de prégnandiol dans l'urine d'hommes normaux. Il traite à cet effet une quarantaine de litres d'urine masculine selon la technique de VENNING ; le prégnandiolglucuronide est précipité sous forme de sel de baryum et caractérisé. Le taux moyen du prégnandiol dans l'urine masculine s'élèverait à 0,7 mg par litre. Il serait probablement d'origine corticosurrénale.

Avec la méthode de VENNING, la 1ère précipitation acétonique laisse généralement un faible résidu, souvent brunâtre. Repris par l'alcool, évaporé et pesé, ce résidu représente pour un litre d'urine des quantités de 1 à 2 mg. Il s'agit d'impuretés qui disparaissent plus ou moins complètement lors de la deuxième précipitation acétonique. Ces impuretés ont un point de fusion bien inférieur à celui du prégnandiolglucuronide.

Nous avons vu (p. 106) que la méthode colorimétrique que nous proposons ne décèle pas de prégnandiol dans les urines masculines.

b) IL N'A ETE OBSERVE CHEZ LA FEMME NI AVANT LA PUBERTÉ, NI APRÈS LA MÉNOPAUSE.

Les observations se rapportant à ces cas sont rares, elles sont négatives tant pour la femme ménopausée que pour l'enfant normale.

STOVER et PRATT [126] ne décèlent pas de prégnandiol, chez une petite fille de trois ans présentant du virilisme.

Par contre GENITIS ET BRONSTEIN [46] observent des éliminations assez importantes de prégnandiol chez les enfants (3, 10 et 15 ans), pseudohermaphrodites présentant des hyperplasies des surrénales.

D'autre part la femme ménopausée, n'éliminant pas de prégnandiol, peut en éliminer quand on lui injecte de la progestérone (BUXTON et WESTPHAL) [25] ce qui n'est pas surprenant.

TRAVAUX PERSONNELS

Un dosage effectué sur l'urine de femme ménopausée a donné un résultat nul.

Une étude plus suivie a été réalisée sur les urines d'une petite fille de quatre ans présentant une puberté précoce essentielle. Les caractères sexuels secondaires, la taille et le squelette sont ceux d'une enfant de 12 ans. Les règles sont apparues depuis l'âge de 4 ans.

Les quantités de prégnandiol éliminées sont restées sensiblement nulles après comme avant l'apparition de la menstruation. Tous les dosages ont été effectués avec la méthode de VENNING, sauf un mené avec notre méthode personnelle.

La méthode de VENNING laisse des résidus de 1 à 1,5 mg par litre dont le point de fusion est très inférieur à celui du prégnandiolglucuronate de soude. L'essai avec notre technique personnelle réalisée en pleine période d'activité lutéale a fourni une coloration jaune-pâle, non caractéristique du prégnandiol.

Un essai témoin sur l'urine d'une enfant normale du même âge a également donné un résultat nul.

Il semble donc que cette enfant malgré son développement sexuel ne métabolise pas la progestérone qu'elle paraît devoir produire. (*).

II. --- CHEZ LA FEMME NORMALEMENT REGLEE

Les travaux ont été réalisés pour la plupart avec la technique de VENNING. Les résultats obtenus concordent : apparition du prégnandiol un ou deux jours après la date présumée de l'ovulation, maximum d'élimination vers le 22e jour du cycle pour un cycle de 28 jours. (3 à 6 mg par 24 heures), disparition dans les 48 heures précédant la nouvelle menstruation.

Il faut faire une place particulière aux intéressants travaux récents de M. JAYLE et O. LIBERT [73] qui trouvent des valeurs plus élevées en employant leur technique personnelle. (**).

1°) TRAVAUX REALISES AVEC LA METHODE DE VENNING.

Selon VENNING et BROWNE [137, 138] l'élimination d'abord faible (1 à 2 mg.) passe par un maximum au premier tiers de la période lutéale puis diminue. La durée de l'élimination varie de 3 à 12 jours. Sur 10 cas étudiés, 6 éliminent le prégnandiol pendant 10 à 12 jours, 3 pendant 6 à 8 jours, 1 pendant seulement 3 jours dans 2 cycles, seulement 6 jours dans un troisième cycle.

La quantité éliminée au total par cycle varie de 3 à 54,6 mg. Les variations sont considérables même chez un seul individu. 40 à 55 mg. par cycle leur paraît une quantité moyenne, autant que l'on puisse établir une moyenne sur le petit nombre de cas suivis. Les chiffres les plus bas (abaissement du total, raccourcissement de la phase lutéale), correspondent à un syndrome de stérilité fonction-

(*) Une étude d'ensemble sur ce cas sera publiée par la suite.

(**) Voir également GUILLEBAUD qui ne trouve pas de prégnandiol au cours de cycles artificiels. [47 bis]

nelle. Les petites quantités observées en fin de cycle s'accordent avec le phénomène de dégénérescence du corps jaune. Dans deux de ces cas, l'ovulation a pu être repérée par l'apparition de phénomènes douloureux et de pertes de sang intermenstruelles. Le prégnandiol est apparu alors 48 heures après dans un cas, 24 heures dans un autre.

Le maximum moyen par 24 heures s'établit pour VENNING et BROWNE à 5 mg., valeur extrême 8 mg.

WILSON, RANDALL, OSTERBERG [150, 151] constatent également des variations considérables tant en durée qu'en quantité chez des femmes à histoire menstruelle normale. Le maximum moyen par 24 heures s'établit pour eux à 3,5 mg. La valeur extrême à 4,5 mg.

Effectuant en même temps dosages de prégnandiol et biopsies de l'endomètre utérin, ils observent une concordance parfaite entre les deux phénomènes : la muqueuse prolifère quand le prégnandiol est éliminé. Des quantités notables de prégnandiol trouvées au cours de la phase œstrogène dans certains cas, coïncidaient avec une prolifération tardive de la muqueuse. Un aspect microscopique anormal est presque toujours associé à des chiffres faibles de prégnandiol.

L'élimination du prégnandiol pendant la phase lutéinique est-elle continue ? Il semble que non. HAMBLEN, ASHLEY, BAPTIST [52], opérant sur les urines de 24 heures, observent des irrégularités importantes dans l'élimination. Des valeurs négatives sont obtenues au milieu de la phase lutéale ; ils attribuent ces variations aux facteurs rénaux et hépatiques plutôt qu'à ceux influençant la production de progestérone. Ces irrégularités sont retrouvées par BUXTON [24] avec des éliminations nulles certains jours.

Ces cas ne se produisent jamais deux jours de suite, la continuité d'élimination observée par VENNING, HENRY et BROWNE [141] serait due au fait que ces auteurs opéraient sur l'urine de 48 heures.

BUXTON [24] signale une élimination nulle chez une femme considérée comme normale, STOVER et PRATT [126] observent également de grandes variations dans le taux d'élimination ; ils ne trouvent pas de prégnandiol avant le 19e jour du cycle ; il disparaît

de 1 à 4 jours avant les règles, l'intervalle le plus commun étant 2 jours.

L'étude de cas anormaux fournit des résultats qui ne sont pas en contradiction avec les précédents.

C'est ainsi que dans une hyperménorrhée douloureuse avec dermatoses prémenstruelles et maux de tête, l'élimination du prégnandiol est très augmentée (135 mg. par cycle). Une thérapeutique oestrogène intensive fait disparaître les symptômes tandis que le taux mensuel de prégnandiol revient à 60 mg. (HAMBLEN [51].

Des jeunes filles présentant par contre une aménorrhée hyperhomonale justifiable d'un traitement à la progestérone, ont une prégnandiolurie inférieure à la normale. (BECLERE et SIMONNET) [11].

2° TRAVAUX DE M. F. JAYLE ET O. LIBERT [73]

Ces auteurs utilisent la technique décrite page 45 avec ses 3 modalités, « dosage direct », « précipitation acétonique », « précipitation éthérée ». Ils étudient 9 cycles consécutifs sur une même femme en pratiquant des dosages fréquents : (12 par cycle), une vérification de la date d'ovulation par prise de la température rectale et du volume des urines par dosage de la créatinine.

Ils arrivent aux conclusions suivantes : (cycle de 28 jours).

Du 1e au 15e jour, les chiffres ne sont pas nuls mais voisins de 3 à 4 mg. en moyenne, quelle que soit la modalité de dosage employé. L'ovulation marquée par le crochet thermique se place le 15e jour. Le prégnandiol ne commence à augmenter que le 20e jour, et atteint un maximum vers le 24e - 25e jour, puis un minimum le 28e jour et le 1er jour des règles. Le maximum est de 8 mg. environ avec le procédé par « précipitation acétonique », 11 mg. environ par « précipitation éthérée », et 14 - 15 mg. par « dosage direct ». Ce dernier chiffre, remarquablement constant, a été trouvé dans tous les cycles. S'il se maintient sans réapparition des règles, il permet le diagnostic précoce de la grossesse. En tenant compte que ces résultats sont obtenus avec une méthode plus sensible que la méthode de VENNING, probablement moins spécifique dans le « dosage direct », ils se révèlent comme très intéressants, en particulier sur la durée d'élimination ramenée ici à une huitaine de jours.

TRAVAUX PERSONNELS

Etude physiologique du prégnandiol.

Quelques dosages de prégnandiol effectués au cours d'un cycle de 30 jours ont donné des résultats concordants avec ceux de VENNING ou de WILSON déjà cités :

L'élimination est nulle pendant la première partie du cycle, nous avons obtenu alors des résidus indéfinissables pesant 1 à 1,5 mg. pour l'urine des 24 heures, comparables à ceux laissés par les urines masculines.

Après la date présumée d'ovulation (14 ou 15 jours avant les règles à venir) les quantités éliminées s'établissent entre 3 et 4 mg.; maximum observé : 4,7 mg. le 24e jour.

Quelques dosages ont été pratiqués sur des urines de femmes atteintes de vaginite granuleuse (urines récoltées le 18e ou 19e jour après les règles). Les résultats obtenus : 6,5 mg. - 3 mg. - 9,6 mg. - 2,4 mg. - 8,6 mg. - sont quelquefois un peu plus élevés que la moyenne admise ; ces augmentations sont peut-être dues à des impuretés car dans les deux cas extrêmes, notre technique colorimétrique a donné des résultats inférieurs (5,6 au lieu de 8,6 ; 4,1 au lieu de 9,6).

b) Avec la méthode colorimètrique au pentachlorure d'antimoine.

Nous avons déjà donné (p. 107) le détail des résultats obtenus au cours de deux cycles. L'élimination du prégnandiol commencerait 2 à 4 jours après l'ovulation, elle durerait une dizaine de jours, atteignant son maximum à peu près au milieu de ce laps de temps. Les quantités éliminées pourraient atteindre 11mg. par jour. Ces constatations ne sont pas en contradiction avec les opinions généralement admises sur le fonctionnement du corps jaune ; elles sont à rapprocher des conclusions de M.JAYLE citées ci-dessus.

III. --- LE PREGNANDIOL AUGMENTE REGULIEREMENT AU COURS DE LA GESTATION

La quantité de prégnandiol éliminée par la femme enceinte croit en fonction de la durée de la gestation, pour atteindre vers son terme des valeurs de 60, 70 mg. et plus.

L'élimination assez lente pendant les 3 premiers mois, dépasse rarement à la fin du 3e mois, 25 mg. par jour ; elle augmente ensuite rapidement pour atteindre de 60 à 80 mg. au 6e mois. Pendant les 3 derniers mois, l'accroissement est beaucoup moins rapide et la moyenne journalière tend vers un palier.

L'élimination quotidienne est très inégale : les variations d'un jour à l'autre, surtout aux approches du terme, sont souvent considérables, atteignant et dépassant 30 mg. ce qui doit inciter à tirer des conclusions prudentes d'un dosage isolé. La courbe d'élimination du dernier mois prend un aspect en dents de scie. Les courbes obtenues par les divers auteurs tendent vers une courbe théorique en forme d'S allongé (sigmoïde) avec deux points d'inflexion.

C'est ainsi que BROWNE, HENRY, VENNING [12] étudiant 8 cas de gestation normale, obtiennent au cours du neuvième mois des quantités journalières de prégnandiol comprises entre 60 et 105 mg. (moyenne 75 mg.)

WILSON et RANDALL [149] effectuent 79 déterminations (technique de VENNING) sur l'urine de 47 femmes enceintes ; parmi lesquelles 3 seulement en cours du premier mois, du fait du petit nombre de femmes venant consulter aussitôt. Ils trouvent les valeurs moyennes suivantes (par 24 heures) : 5 à 10 mg. au cours du premier mois, 25 mg. entre le 4e et le 5e mois, 53 mg. au 9e mois, l'augmentation étant surtout sensible du 4e au 7e mois.

Ils observent les fortes variations quotidiennes que nous indiquions ci-dessus, aussi bien chez une même femme, que chez deux femmes du même âge de gestation, avec des sauts de 30 à 126 mg. au 9e mois.

STOVER et PRATT [126] par contre, indiquent des valeurs bien inférieures, le chiffre quotidien maximum ne dépassant pas, en fin de grossesse 25 mg. Ils donnent ainsi une courbe à faible pente s'étendant tout au long de la gestation de 6 à 20 mg. Ces chiffres sont en contradiction avec ceux indiqués par tous les auteurs, il faut dire qu'ils ne reposent que sur 7 dosages, effectués de plus sur 7 femmes différentes.

ROBEY [117] a dosé le prégnandiol tous les mois, pendant 7 mois, sur une femme enceinte. Il donne une courbe d'élimination du type général indiqué ci-dessus (5 mg. fin du 2e mois, 6 mg. fin

du 3e 28 mg. fin du 4e, 34 mg. fin du 5e, 50 mg. fin du 6e, 78 mg. fin du 7e).

JAYLE et O. LIBERT [73] appliquent leur technique simplifiée et leur technique par précipitation acétonique à des femmes enceintes (voir p. 50). Ils obtiennent chez ces dernières, avec la technique par précipitation acétonique, des résultats concordant avec ceux des autres auteurs : 80 mg. vers le 260e jour, 44 mg. au moment du travail ; ils observent des valeurs de 4 à 5 mg. pendant les 30 jours suivant l'accouchement. La technique simplifiée, moins spécifique donne des chiffres plus élevés, atteignant un maximum (131 mg.) un peu plus tôt que ceux obtenus par précipitation acétonique.

ALLEN et VIERGIVER [3] utilisant leur technique personnelle ne sont pas en contradiction avec les précédents : 26 mg. en moyenne le 3e mois, 33 au 4e, 41 au 5e, 52 au 6e, 68 au 7e, 87 au 8e, et enfin 108 mg. au 9e.

G. E. S. JONES, E. DELFS et H. M. STRAN [74] étudient 18 grossesses avec la méthode d'ASTWOOD et JONES [5]. Ils observent des valeurs comprises le plus souvent entre 6 et 20 mg. pendant la première période de la gestation (période lutéale). Celle-ci se terminant vers le 64e-78e jour, est suivie de la période placentaire au cours de laquelle l'augmentation se poursuit pour atteindre un maximum vers le 250e jour. (85 mg. par 24 heures en moyenne.) Cette valeur peut se maintenir ou s'abaisser par la suite ; au cours de cette seconde période, les auteurs n'ont observé qu'exceptionnellement des valeurs au dessous de 40 mg. ou au-dessus de 100 mg. (*).

(*) JONES DELFS et STRAN, dans leur communication [74] citent certains travaux dont nous n'avons pu avoir connaissance en temps utile :

HAIN (AM) The excretion of oestrogen and pregnandiol by pregnant and parturient women. J. Endocrinol 1940 (2) 104. — HAIN (A.M.) Further observations on the role of progesterone (Pregnandiol) and oestrogen in pregnancy. J. Endrocrinol 1942 (3) 10 — THOMPSON (K.N.), MUSSELMAN (I.K.) et SEER (H.A.) The excretion of pregnandiol glycuronidate by a woman who delivered prematurely. Internat Clin. 1941 (1) 217.

TIEN (D.S.P.) The significanceof pregnandiol in pregnancy urine Chinese M.J. 1941 (59) 416.

Voir également la publication de BACHMAN [6] et celle de DAVIS [36].

Certaines modifications de ces taux ont été observées au cours de certaines *grossesses pathologiques* (COPE [31]).

Les toxémies de la grossesse (états prééclamptiques) entraînent un abaissement considérable du taux du prégnandiol (WEILL [145]), (VENNING et BROWNE [139, 13], (COPE [29]). Ce fait n'a pas été retrouvé par STOVER et PRATT [126] dans une toxémie sévère. SMITH et WERTHESSEN [124] ont observé un abaissement dans une grossesse associée à un chorioépithélioma.

Il semble que l'on puisse, dans certains cas, diagnostiquer la *menace d'avortement* par la diminution de la prégnandiolurie. GUTERMAN [48] utilise à cette fin sa technique. BUXTON cite une femme avortant habituellement traitée à la progestérone, n'éliminant cependant que 3 à 4 mg. de prégnandiol ; elle avorte bientôt. Par contre, chez 4 autres femmes, ayant déjà eu 3 avortements au moins, l'élimination de prégnandiol est normale [24]. Le même fait est signalé par STOVER et PRATT [126]. Certains avortements pourraient être attribués à une incapacité d'utiliser la progestérone, que son origine soit exogène ou endogène.

TRAVAUX PERSONNELS

Des dosages de prégnandiol ont été effectués aussi régulièrement que possible sur des femmes enceintes, primipares, en bonne santé. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau n° 22 et la courbe ci-contre.

Le cas n° 1 (Mme F...) et n° 4 (Mme De...) ont pu être suivis jusqu'à l'accouchement qui eut lieu sensiblement à la date prévue.

Le cas n° 2 (Mme D...) a également été suivi jusqu'à l'accouchement, mais celui-ci est arrivé prématurément au terme de 7 mois et demi (enfant viable, poids 2,290 Kg.). La grossesse avait été normale jusqu'au 6e mois ; il s'est alors déclanché un ictère qui disparut aussitôt l'accouchement.

Le cas n° 3 (Mme C...) n'a pu être suivi au delà du 5e mois, par suite des événements de l'été 1944. La grossesse s'est poursuivie normalement jusqu'au terme.

Nous avons rassemblé à la dernière ligne du tableau quelques chiffres provenant de dosages effectués sur 3 femmes différentes. Les 3 derniers ont été effectués sur le même sujet à 5 jours d'intervalle au début du 9e mois.

Tableau n° 22

Mois	1er	2e		3e		4e		5e			6e	7e	8e			9e				
Jours		45	60	70	90	100	120	130	136	150	160	180	210	215	230	240	247	253	256	258	261
Cas n° 1			13		23		32		40	34		84	66		63	70	129	53	89		70
Cas n° 2		12,7	20	18	27		28	31	21	64		72	79,3	79,2	(A)						
Cas n° 3			6,7		22		29		28		36										
Cas n° 4						8,2	16		26,4	51,8	48						42,5		55,5		
Divers						16,8		14			34						40	43,8		75,6	

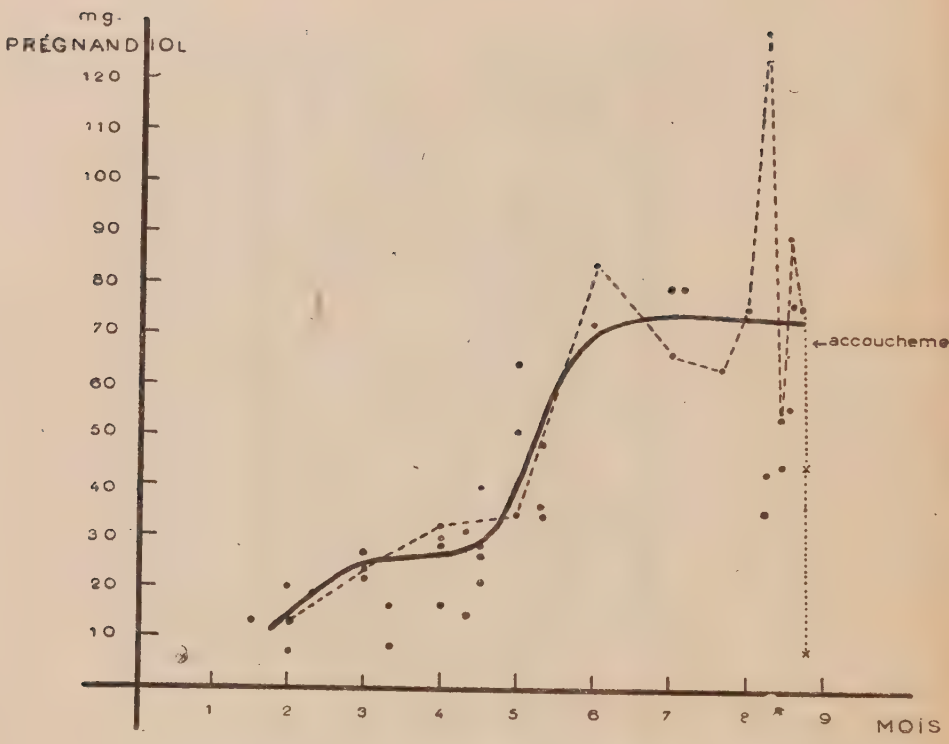


Figure N. 9 - Elimination au cours de la gestation :

1. - *Les points correspondent aux valeurs indiquées dans le tableau n° 23 ;*
2. - *Le tracé plein représente la courbe moyenne ;*
3. - *Le tracé tireté figure une courbe typique* (cas n° 1).

Remarques.

Tous ces dosages ont été effectués par la méthode de VENNING ; les valeurs sont exprimées en milligrammes de prégnandiol par 24 heures. Le volume des 24 heures a pu dans une partie des cas, être mesuré de façon plus ou moins empirique par les « donneuses ». La date supposée de la fécondation a été définie par le 15e jour après les dernières règles.

Conclusions.

On peut déduire de ces 42 dosages des conclusions d'ensemble : l'élimination augmente régulièrement pendant les 4 ou 5 premiers mois. Les chiffres du 2e mois sont déjà nettement différenciés de ceux rencontrés au cours du cycle menstruel. Ceux du 3e et du 4e mois s'établissent entre 20 et 30 mg. Une poussée considérable pendant le 6e mois correspond probablement à la mise en route de la fonction endocrine du placenta. Un palier s'établit sur les trois derniers mois de la gestation, non sans variations brusques et parfois considérables. Les valeurs si différentes fournies à quelques jours d'intervalle pour le cas n° I (129 mg. et 53 mg. par 24 heures), sont à rapprocher du chiffre énorme cité dans le tableau n° 28 (148 mg.) et des écarts semblables observés par WILSON et RANDALL [149] (courbe en dents de scie).

Ce palier s'établit aussi bien, pour des grossesses normales, vers 50 mg. (cas n° 4) que vers 75 mg. (cas n° I et n° 2). Il serait donc téméraire à cette époque de tirer des conclusions d'un dosage isolé.

QUE DEVIENT LE PRÉGNANDIOL AU MOMENT DE L'ACCOUCHEMENT ?

Le prégnandiol disparaît de l'urine après l'accouchement, ce qui correspond à l'arrêt de la production de progestérone (disparition du placenta).

Il est intéressant de savoir si cette disparition de prégnandiol coïncide exactement avec le moment du travail, si elle est brutale ou si elle s'effectue progressivement. L'étude précise en est rendue difficile par l'impossibilité de prévoir la date exacte, ce qui oblige à de nombreux dosages, un peu au hasard ; par la présence presque obligatoire de sang dans les urines d'accouchée, et par les pertes fréquentes d'urine au cours du ramassage.

ROBEY [117] a recherché si la diminution de la prégnandiolurie commençait avant l'accouchement. Le déclanchement du travail serait alors précédé par une diminution de la secrétion de progestérone.

Il a effectué 21 dosages sur 6 femmes enceintes, répartis sur une quinzaine de jours avant et après l'accouchement. Les valeurs

trouvées avant varient de 30 à 60 mg. (l'une atteint 157 mg.), les dosages effectués ensuite, de 3 à 8 jours après l'accouchement, sont tous négatifs. Quelques dosages effectués le jour même du travail (urine de 24 heures) montrent plus de variétés : 2 primipares éliminent respectivement 14,5 mg. et 54 mg., 4 multipares n'éliminent par contre que des traces indosables. ROBEY conclut de ces résultats que « l'élimination urinaire du prégnandiol diminue rapidement dans les jours qui précèdent le travail suivant une courbe voisine de celle des corps oestrogènes ».

Divers auteurs par contre, tout en constatant l'annulation absolue de l'élimination du prégnandiol dans les 3 ou 4 jours qui suivent l'accouchement, observent des quantités nettement dosables le 1er ou le 2e jour immédiatement après.

Pour WILSON, RANDALL et OSTERBERG [151], le prégnandiol ne disparaît pas immédiatement. Ils observent sur 51 cas dans les 4 jours après l'accouchement d'assez nombreuses valeurs à 6 mg., une valeur maximum à 10,7 mg. Ils estiment que le prégnandiol est présent en valeurs mesurables dans 50 pour cent des cas.

STOVER et PRATT [126] écrivent « qu'il n'y a pas de chute démontrable de la prégnandiolurie avant le commencement du travail ».

VENNING et BROWNE admettent « que la substance disparaît brusquement dans les 24 heures après la délivrance, mais que la présence de sang peut gêner la détermination de petites quantités ». Ils dosent dans un cas après cathétérisme, 7 mg. par 24 heures, les 3 premiers jour après le travail.

M. F. JAYLE et O. LIBERT [73], appliquant à la fois leur dosage direct et leur dosage par cristallisation acétonique (voir p. 54) trouvent de fortes quantités le jour du travail, bien qu'en diminution sur les dosages précédents (68 mg. par dosage direct, 44 mg. par cristallisation acétonique), et de petites quantités équivalentes au cycle normal le mois suivant l'accouchement (14,1 et 5,2 mg. le 7e jour ; 13 et 4,7 mg. le 30e jour).

TRAVAUX PERSONNELS

Nous nous sommes efforcés de doser le prégnandiol les jours précédant et suivant l'accouchement chez 5 femmes. Trois d'entre

elles avaient été suivies pendant toute la gestation (cas nos 1, 2 et 4 cités page 126). Les deux autres n'ont été étudiées qu'au moment de l'accouchement. Nous rappelons que dans le cas n° 2 il s'agit d'un accouchement prématuré au terme de 7 mois et demi. Les autres grossesses, normales, se sont terminées à terme. Toutes sont primipares.

Les résultats sont consignés dans le tableau n° 23 (*) (Méthode de VENNING) (voir également la figure n° 10).

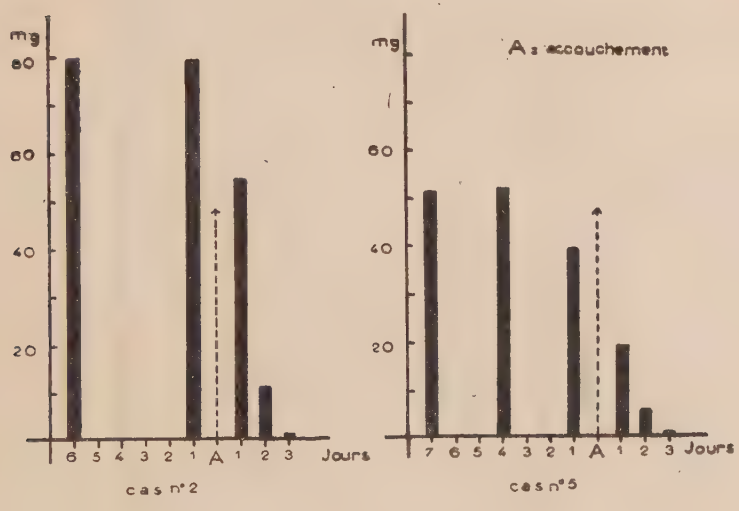


Figure N. 10
Elimination au moment de l'accouchement.

(*) L'indication « traces » correspond à des quantités inférieures à 2 mg. Le chiffre 17 marqué d'un astérisque est un chiffre minimum, la totalité des urines n'ayant pu être recueillie. Les quantités éliminées sont exprimées en milligrammes de prégnandiol par 24 heures.

Tableau n° 23

Jours avant et après l'accouchement	10e	8e	7e	6e	5e	4e	3e	2e	1er	Accouchement	Après l'accouchement		
											1er	2e	3e
Cas n° 1		89					70					43	8
Cas n° 2				79,3					79,2		54	10,4	traces
Cas n° 4					55,5						12,6		4,2
Cas n° 5		51			52			38			*17	5	traces
Cas n° 6	45										10	6,4	6,5

Conclusions

Il faut de 48 à 72 heures pour que l'élimination du prégnandiol soit terminée. Elle ne s'annule peut-être pas complètement, mais se stabiliserait vers les taux rencontrés au cours de la phase lutéale du cycle normal (JAYLE [73]).

La durée de cette phase n'a pas été déterminée.

Etant donnée la forte concentration du sang en progestérone et en prégnandiol dans les jours qui précèdent l'accouchement, il n'est pas étonnant que l'arrêt de l'élimination dû à la disparition du placenta ne soit pas instantané.

LE DOSAGE DU PRÉGNANDIOL PEUT-IL SERVIR AU DIAGNOSTIC PRÉCOCE DE LA GROSSESSE ?

Le prégnandiol est éliminé avec plus d'abondance par la femme enceinte que par la femme normale. La question est de savoir si cette augmentation est assez rapide et assez notable pour permettre le diagnostic précoce de la grossesse. Dans ce cas, le procédé ne mettant en œuvre que des moyens chimiques, présenterait des avantages certains sur les diverses méthodes biologiques.

La méthode de VENNING manque de sensibilité pour un tel usage. Cependant, WILSON, RANDALL, OSTERBERG [151] considèrent comme une preuve sérieuse l'élimination en quantités normales ou supérieures à la normale (au moins 4 mg.) chez une femme présentant un retard, et d'habitude bien réglée. BUXTON [24] a comparé sur 20 cas (10 positifs, 10 négatifs), le « test prégnandiol », et les tests d'ASCHEIM ZONDEK et de FRIEDMAN. Les réponses concordent parfaitement. Il cite un cas où le dosage du prégnandiol a permis de découvrir une fausse couche inaperçue autrement. HAIN et ROBERTSON ont pu aussi doser le prégnandiol avant et après la fécondation et déceler précocement celle-ci [49], [50].

Des méthodes plus récentes ont donné des résultats encore plus encourageants. GUTERMAN [48] (1944), présente sa technique qualitative comme un « test de la grossesse humaine ». Pratiquée dans des conditions déterminées, elle permettrait de diagnostiquer la grossesse par oui ou par non. Il appuie cette assertion d'une série de résultats positifs. On peut lui reprocher un certain manque de spécificité.

La technique simplifiée de M. F. JAYLE et O. LIBERT [73] décrite page 54 sans doser de façon absolument spécifique le prégnandiol, fournit des résultats d'un grand intérêt au début d'une grossesse. Nous avons déjà vu qu'au cours du cycle cette technique donne un chiffre maximum très constant, de 14 à 15 mg. vers le 24e jour, avec chute rapide à l'approche des règles. En cas de fécondation, cette chute n'a pas lieu ; le taux au contraire s'élève pour atteindre 26,5 mg. par exemple le 26e jour après les dernières règles. Ces auteurs estiment que la présence de 15 mg. et plus à l'époque présumée des règles absentes permet de conclure à une grossesse certaine (*).

Le dosage du prégnandiol détrônera-t-il les tests biologiques sur la « lapine » ou la « rate » ? Il est certain que le maintien et l'augmentation de son élimination alors que les règles sont attendues en vain prouvent la persistance du corps jaune, c'est-à-dire la fécondation. Le problème n'est plus biologique, mais technique. Il sera probablement résolu par les progrès des méthodes de dosage : moins laborieuses, plus fidèles, plus sensibles.

IV. — ELIMINATION DU PREGNANDIOL CHEZ LES ANIMAUX

1°) Sous sa forme *glucuroconjuguée,* le prégnandiol n'a été isolé jusqu'ici que de l'urine humaine.

Les essais de WESTPHAL et BUXTON [148] à partir de l'urine de lapine gravide ou normale, de chatte gravide ou normale, de guenons castrées et de singes mâles recevant de la progestérone ont été négatifs.

KNOPPERS [78] dans celle de la lapine et de la chienne gravide ou non, ELDER dans celle du chimpanzé [38], FISH, DORFMAN et YOUNG [40] dans celle de cobaye recevant de la progestérone et du prégnandiol glucuronate de sodium, n'eurent pas plus de succès.

Cependant on a pu en extraire des quantités appréciables de l'urine de lapines recevant de la progestérone ou même de la désoxycorticostérone (HOFFMAN et BROWNE [66]) (voir p. 141).

(*) Voir page 107 un exemple d'emploi de notre technique personnelle.

2°) Par contre, l'urine de diverses espèces contient du *prégnandiol non conjugué,* ses isomères ou des corps très voisins.

C'est ainsi que l'urine de vache gravide contient des quantités assez élevées de prégnandiol 3 α 20 α, de l'alloprégnandiol 3 α 20 α et de l'alloprégnandiol 3 β 20 α (MARKER [82]).

L'urine de jument gravide contient du prégnandiol 3 α 20 α, de l'alloprégnandiol 3 α 20 α, de l'alloprégnandiol 3 β 20 α, des prégnanétriols 3 α 4 β 20 α (MARKER [87, 88]) ; 3 α, 6, β, 20 α (ODELL et MARRIAN [110]) et même un prégnane tétrol [87], les dérivés de la série de l'urane, uranediol, uranetriol, uranetétrol (MARKER [98, 101], sans compter de nombreux corps intermédiaires (prégnanolones, prégnanediones) [97, 61].

De l'urine de truie gravide, MARKER a extrait l'épiprégnanolone et l'alloprégnanolone [100].

L'urine de chimpanzé gravide contient du prégnandiol. FISH et ses collaborateurs [40] l'ont extrait grâce à une technique assez laborieuse. Les rendements sont faibles : 48,3 mg. à partir de 61 litres.

Les lapines recevant simultanément de la progestérone et de l'oestradiol (ou de l'oestrone) éliminent du prégnandiol (HEARD, BAULD, HOFFMAN [59]).

Cependant l'urine de guenons « rhesus » gravides ou de « rhesus » mâles recevant de la progestérone en grande quantité, ne contient pas de prégnandiol (MARKER et HARTMANN [85]). Ce fait est à rapprocher de ceux que nous examinerons plus loin touchant la mauvaise utilisation par la femme de la progestérone injectée.

3°) Il est intéressant de noter que l'urine de certains mâles peut contenir des quantités élevées de prégnandiol non conjugué et de ses isomères : alloprégnanetétrol et uranetriol dans l'urine d'étalon [96] ; prégnandiol $\alpha\alpha$, alloprégnandiol $\alpha\alpha$, alloprégnandiol $\beta\alpha$, en grande quantité, dans l'urine de taureau [103]. L'urine de bouvillon par contre n'en contient pas [83] (MARKER).

Le prégnandiol sous forme conjuguée n'a pas pu être extrait des urines de taureau (STRICKLER [127].

Il ne serait donc présent là aussi que sous la forme libre.

Ce prégnandiol n'est évidemment pas d'origine ovarienne.

Pour terminer, nous indiquerons les valeurs comparées obtenues par MARKER [103] à partir de un gallon (4,54 litres) d'urine.

Tableau n° 27

	Prégnandiol $\alpha\,\alpha$	Allopregnandiol $\alpha\,\alpha$	Allopregnandiol $\beta\,\alpha$
Femme enceinte	50 mg.	25 mg.	6 mg.
Femme non enceinte	8 mg.	4 mg.	—
Homme	0 mg.	0 mg.	0 mg.
Jument gravide	50 mg.	25 mg.	6 mg.
Vache gravide	25 mg.	15 mg.	3 mg.
Taureau	100 mg.	50 mg.	—

Il est difficile de tirer conclusion de ces observations : affirmer que la glucuroconjugaison ne se fait pas chez l'animal exigerait la certitude qu'il n'y a pas eu d'hydrolyse au cours du ramassage des urines.

D'autre part l'origine du prégnandiol trouvé en si grande quantité chez le taureau demeure du domaine des hypothèses.

CHAPITRE II

ORIGINE ET TRANSFORMATION DU PREGNANDIOL

Les conclusions des travaux résumés dans ce chapitre sont parfois contradictoires. L'interprétation doit en être prudente, néanmoins un grand nombre de points peuvent être considérés comme établis :

1°) Le prégnandiol doit être surtout considéré comme *le produit de réduction de la progestérone*. L'étude de son élimination urinaire (voir chapitre I) nous a déjà montré le parallélisme étroit existant entre la présence de cette hormone et l'élimination du prégnandiol. D'autre part la transformation de la progestérone en prégnandiol est chimiquement possible.

BUTENANDT [18] et MARxER [81] l'ont montré « in vitro » : la progestérone réduite, puis oxydée, donne naissance à un mélange de prégnandione et d'alloprégnandione, montrant ainsi la formation du prégnandiol et de l'alloprégnandiol. Les prégnandiols constituent une étape intermédiaire ; tous ces corps ont été isolés des urines, ce qui rend probable une transformation identique « in vivo ».

Dans l'organisme, les expériences de réduction en prégnandiol de la progestérone injectée ont donné des résultats inconstants. Les rendements observés sont toujours faibles, voire nuls, comme si cette progestérone étrangère cependant active, ne suivait pas le chemin tracé pour la progestérone endogène. Il y a là un point assez mal éclairci.

2°) La progestérone transformée peut avoir diverses origines :

Origine lutéale : comme le montre l'élimination du prégnandiol au cours du cycle menstruel et au début de la gestation.

Origine placentaire : mise en évidence par l'élimination massive à la fin de la gestation, démontrée par la persistance et l'augmentation de l'élimination du prégnandiol après ablation du corps jaune de gravidité.

Origine corticosurrénale possible : on a isolé en effet de la progestérone du cortex surrénal. La transformation en prégnandiol, concurremment avec celle de la désoxycorticostérone pourrait expliquer certaines éliminations élevées observées au cours de troubles fonctionnels de cette glande (voir p. 111).

3°) Ces transformations se font en des lieux mal définis.

L'endomètre utérin semble jouer un rôle important chez la femme sans être pourtant indispensable. La femme hystérectomisée et l'homme métabolisent ailleurs la progestérone.

Le foie est probablement l'organe choisi pour la glucuroconjugaison du prégnandiol : nous n'en avons en vérité aucune preuve.

Il est à remarquer que cette forme conjuguée n'a été trouvée jusqu'ici que dans l'urine humaine, les animaux éliminant la forme libre.

Au niveau *des reins*, enfin, le prégnandiol se comporte peut-être comme une substance à seuil d'élimination. Les mauvais rendements de transformation de la progestérone injectée sont à rapprocher à ce point de vue du délai observé entre la formation du corps jaune et l'apparition du prégnandiol. Mais ce n'est qu'une hypothèse.

4°) Enfin la transformation physiologique de la *désoxycorticostérone* en prégnandiol a été démontrée chez le lapin et, avec moins de certitude, chez l'homme.

IMPORTANCE DU PLACENTA

Un assez grand nombre d'observations cliniques montre que la gestation n'est pas interrompue après ovariectomie bilatérale ou exérèse du corps jaune ; le danger d'avortement semble d'autant plus réduit que cette opération est effectuée plus tardivement. D'autre part, l'étude histologique montre un vieillissement et une dégé-

nérescence progressive du corps jaune vers la fin de la gestation.

Cependant, l'élimination du prégnandiol croit constamment au cours de la grossesse, davantage dans la 2e moitié que dans la première ; on a émis l'hypothèse que le placenta secréterait alors de la progestérone et en quantité beaucoup plus importante que le corps jaune.

Le dosage du prégnandiol dans quelques cas de suppression chirurgicale du corps jaune de gestation fournit d'importants renseignements :

BROWNE, HENRY, VENNING [14] ne constatent pas de modification de l'élimination du prégnandiol chez une femme ovariectomisée au 4e mois de gravidité.

JONES et WEILL [75] présentent un cas d'ablation du corps jaune de grossesse le 58e jour après les dernières règles. Il n'y a pas d'avortement. Le prégnandiol continue d'apparaître jusqu'à l'accouchement normal, sauf pendant les 12 jours qui suivent l'opération. Ces auteurs émettent l'hypothèse que la production placentaire de progestérone serait déclenchée par la « pointe » des substances gonadotropes.

SEEGAR et DELFS (120) signalent un cas d'ovariectomie bilatérale au cours d'une grossesse. L'élimination du prégnandiol n'en est pas modifiée.

WILSON et RANDALL (149) indiquent sans autre détail, de nombreux cas d'ablation du corps jaune après le 4e mois sans interruption de la grossesse et attribuent au placenta l'augmentation brutale du prégnandiol à cette époque.

TRAVAUX PERSONNELS.

Nous avons pu doser le prégnandiol chez une femme enceinte dont on avait dû enlever le corps jaune à la fin du 2e mois. Elle fut soumise ensuite pendant six semaines à un traitement par la progestérone. La grossesse se poursuivit favorablement et se termina par un accouchement normal (durée 264 jours).

4 dosages de prégnandiol furent effectuées au cours des 4 derniers mois en dehors de la période de traitement par la progestérone. Ils fournirent des valeurs sensiblement normales, les 3 premières étant peut être un peu au-dessous de la moyenne ; la 4e par

contre très élevée correspondant à une de ces pointes que divers auteurs et nous-même avons déjà signalées.

Ce cas est donc en parfait accord avec ceux signalés ci-dessus et tend à prouver l'origine extra-lutéale du prégnandiol pendant la grossesse. On peut en conclure que la présence du corps jaune n'est pas nécessaire à la fin de celle-ci.

Observation.

Mme C..., dernières règles : 27 février 1944, primipare, opérée le 11 mai de kystes multiples de l'appareil folliculaire des deux ovaires, allant du volume d'une cerise à celui d'un gros pamplemousse, une dizaine de kystes sur l'ovaire droit, un peu moins sur l'ovaire gauche ; à droite, enlèvement d'un beau corps jaune, de cinq grammes. La malade reçoit dès l'opération des injections de progestérone (deux fois 5 mg. par jour) plus espacées après, et ensuite une toutes les semaines ; toute thérapeutique est arrêtée fin juin. L'accouchement a lieu le 1er décembre. Les résultats des dosages de prégnandiol (Méthode de VENNING) sont consignés dans le tableau numéro 28.

Tableau n° 28

	Date	âge de la grossesse	prégnandiol par 24 heures en mg.
Dosages de prégnandiol	5 août 1944	6e mois	21
	25 septembre	7e mois	36
	10 octobre	8e mois	43
	10 novembre	9e mois	148

Accouchement le 1er Décembre

ORIGINE CORTICOSURRENALE DU PREGNANDIOL

Le prégnandiol est surtout considéré comme le produit de transformation de la progestérone. Un certain nombre de travaux réalisés depuis quelques années, démontrent qu'il peut également provenir de la transformation des hormones stéroïdes du cortex surrénal, plus particulièrement de la transformation de la désoxycorticostérone.

En 1939, VENNING, WEILL, BROWNE (142) étudient deux jeunes femmes présentant un syndrome adrénogénital. L'une (carcinome du cortex avec virilisme), élimine 12 mg. de prégnandiol par jour pendant 7 jours. Le corps jaune n'est pas trouvé à l'autopsie. L'autre élimine 20 à 30 mg. par jour pendant 2 semaines, et montre une hyperplasie de la surrénale gauche. Ces observations sont confirmées par SALMON, GEIST et SALMON (virilisme) [118] (1941) WINTERSTEINER, [152] et par FINKLER [39] (1941). Celui-ci présente une femme de 25 ans (syndrome adréno-génital) qui élimine 21,9 mg. de prégnandiol pour les premiers dix jours, puis 29 mg. par jour en moyenne les quatre jours suivants.

BUTLER et MARRIAN [23] en 1937, avaient déjà isolé dans l'urine de deux jeunes femmes présentant ce syndrome du prégnandiol et le prégnanétriol 3-17-20.

GENITIS et BRONSTEIN [46] (1942) signalent trois cas d'enfants pseudohermaphrodites (3, 10, 15 ans), qui éliminent d'assez grandes quantités de prégnandiol (jusqu'à 20 mg. par 48 heures ; dans un dosage isolé chez le plus vieux, 36 mg. par 24 heures). Ils présentaient des adénomes ou des hyperplasies surrénales.

Ce prégnandiol peut provenir du métabolisme de la progestérone mise en évidence dans le cortex surrénal (BEALL et REICHSTEIN [10], HIRSCHMANN [64]). Mais il peut provenir aussi du métabolisme des stéroides propres au cortex surrénal, tels que la désoxycorticostérone isolée par REISCHSTEIN et VON EUW [116] (FISH [41]).

CUYLER, ASHLEY, HAMBLEN [34] 1940, ont extrait du prégnandiol glucuronate de sodium de l'urine d'homme en bonne santé après administration de désoxycorticostérone. Ils trouvent 29 et 16 mg. de prégnandiolglucuronate après injection intramusculaire de 25 et 50 mg. d'acétate de désoxycorticostérone. Mais ils n'ont pu confirmer cette observation chez 3 autres hommes (CUYLER, HIRST, POWERS, HAMBLEN [35] ni démontrer une augmentation nette du prégnandiol dans un groupe de femmes recevant de l'acétate de désoxycorticostérone.

HOFFMAN, KAZMIN et J.S.L. BROWNE [66] ont prouvé la transformation en prégnandiol de l'acétate de désoxycorticostérone injectée à des lapines. Cet animal est également capable de métaboliser la progestérone injectée (voir p. 144). L'expérience a porté

sur l'urine de huit lapines (méthode de VENNING). Le prégnandiol-glucuronide extrait a été caractérisé chimiquement ; le rendement de la transformation (5,6 à 17,6 pour cent) est du même ordre que celui de la transformation de la progestérone chez cet animal..

La transformation par le lapin, a été également démontrée par U. WESTPHAL [147] avec un rendement de 10 à 20 pour cent. Le prégnandiolglucuronate formé a pu être isolé à l'état pur. Le fait est confirmé par HORWITT [69] chez l'homme et le chimpanzé ovariectomisé. Cependant, PORTES, SIMONNET et ROBEY [114] n'ont pu retrouver de prégnandiol dans l'urine humaine après injection de 100 mg. de désoxycorticostérone. Nous rapprocherons de ces observations les résultats obtenus avec notre technique personnelle. (voir p. 111).

TRANSFORMATION DE LA PROGESTERONE INJECTEE EN PREGNANDIOL

Si la progestérone s'élimine sous forme de prégnandiol l'injection de cette hormone devrait entraîner l'apparition dans l'urine de quantités correspondantes de prégnandiol. De nombreux expérimentateurs se sont attachés à démontrer ce fait avec des fortunes diverses et l'ensemble des résultats est assez contradictoire. Toutes les recherches analytiques ont été effectuées selon la technique de VENNING.

VENNING et BROWNE (1937) [138] injectent 19, 38 et 30 mg. de progestérone cristallisée à trois femmes dépourvues d'activité lutéale. Ils en retrouvent 46, 40 et 12 pour cent sous forme de prégnandiol glucuronade de sodium.

Les mêmes auteurs en 1938 [139] ne retrouvent pas de prégnandiol chez deux femmes hystérectomisées après injection de progestérone, tandis que 41 à 58 pour cent du prégnandiol glucuronate de sodium injecté sont retrouvés, ils en déduisent que la transformation se fait dans l'utérus.

Ces auteurs retrouvent 20 à 30 pour cent de la progestérone injectée pendant la phase lutéale du cycle normal. L'injection simultanée d'urine de grossesse augmente le rendement (42 à 70 pour 100).

BUXTON et WESTPHAL (1939) [25] injectent 30 mg. de progestérone par jour (3 jours de suite), à une femme ménopausée depuis 11 ans, et à 3 hommes. Les sujets éliminent alors seulement des quantités de prégnandiol de 1 à 6 mg. par jour ; l'un des hommes, addisonien et tuberculeux, élimine une moyenne de 8,2 mg. pendant 4 jours. pendant la période suivante de 24 heures ; il éliminera 20 mg. soit 67 pour cent de la progestérone injectée.

Par contre STOVER et PRATT (1939) [126] injectant une solution huileuse de progestérone à une femme, ne retrouvent pas de prégnandiol.

HAMBLEN, ASHLEY, BAPTIST [52] HAMBLEN [51] n'observent également aucune modification de la prégnandiolurie chez des malades traitées par des solutions huileuses de progestérone.

Reprenant l'étude de la question, HAMBLEN, CUYLER, POWELL, ASHLEY, BAPTIST (1939) [55] [56] déterminent la prégnandiolurie et étudient en même temps l'endomètre par biopsie (sur 7 femmes).

L'administration de progestérone seule conduit à un rendement en prégnandiol de 8,2 pour cent (95 urines de 24 heures ont été traitées). L'élimination moyenne individuelle ne dépasse pas 0,64 mg.

L'administration simultanée d'œstrogènes et de progestérone conduit à un rendement de 15,5 pour cent. L'élimination moyenne atteint 1,27 mg.

L'administration d'œstrogène seule montre une prégnandiolurie augmentée (moyenne 1,32 mg.) (*).

Enfin pendant les intervalles du traitement, la prégnandiolurie moyenne est de 1,84 mg.

L'injection de progestérone cristallisée n'augmente donc pas la production de prégnandiol, mais au contraire diminue le métabolisme de la progestérone endogène. Il semble que l'administration simultanée d'œstrogène prévienne la chute du métabolisme spontané de la progestérone, mais on ne peut pas en déduire que les œstrogènes relèvent le métabolisme spontané de la progestérone injectée.

(*) Ce fait est en opposition avec les travaux de PATTEE, VENNING et BROWNE [111]. Ces auteurs ont montré en effet que l'administration de benzoate d'œstradiol pendant le cycle menstruel diminue toujours l'élimination du prégnandiol et peut même empêcher la formation du corps jaune.

Les mêmes auteurs se sont demandé quel chemin suivait la progestérone cristallisée injectée ; ils l'ont recherchée dans l'urine (HAMBLEN, CUYLER, HIRST (1940) [53,54] mais malgré l'injection de fortes doses de progestérone (200 mg. en tout), aucune élimination urinaire de cette hormone n'a été décelable par les test d'ALLEN et CORNER ; l'élimination sous forme de prégnandiol restait faible et non proportionnée (3 à 5 mg.) [36].

Les résultats étaient également nuls par injection de prégnéninolone.

HOFFMAN et VON LAM [68] ont également observé la disparition quasi totale de la progestérone injectée à des femmes castrées ou ménopausées ; l'urine n'élimine que des produits inactifs constitués pour 45 pour 100 par du prégnandiol.

COPE [30] intrigué à juste raison par ces résultats contradictoires reprend la question. Ses essais sont pratiqués sur des femmes sans activité lutéale. Les résultats sont inconstants et les rendements petits. Un premier sujet n'élimine aucun prégnandiol malgré l'injection de 30 mg. de progestérone. Chez un second, le prégnandiol apparait, mais le rendement de la transformation n'est que de 6 pour cent. Il s'abaisse encore par traitement préalable, à l'oestrone, poursuivi pendant trois semaines.

Un troisième sujet fournit le rendement optimum de 9 pour cent. Il existe toujours un certain laps de temps entre la première injection de progestérone et l'apparition du prégnandiol (4 jours). Ce retard est à rapprocher du retard semblable après l'ovulation dans le cycle normal. Une certaine saturation serait donc nécessaire.

ALLEN, VIERGIVER et SOULE [4] plus récemment ont observé la transformation en prégnandiol glucuronide de la progestérone et de l'anhydrohydroxyprogestérone administrée par voie buccale.

Ces observations sont à rapprocher de celles d'HOFFMAN [65 bis] qui retrouve du prégnandiol dans l'urine de lapins, mâles ou femelles recevant de la progestérone.

Tout ceci est assez déconcertant : dans l'état actuel de la question on ne peut conclure au parallélisme absolu entre la production de la progestérone et l'élimination du prégnandiol et encore moins définir le cœfficient de transformation de la progestérone injectée [144].

ROLE DE L'UTERUS
DANS LE METABOLISME DE LA PROGESTERONE

D'après les quelques travaux publiés, l'utérus et plus spécialement l'endomètre, joue un rôle certain dans le métabolisme de la progestérone mais il n'est pas indispensable.

Pour les uns, l'endomètre est le lieu de transformation de la progestérone en prégnandiol ; en son absence, cette opération devient impossible et le prégnandiol n'apparaît plus dans les urines, même après injection de progestérone.

VENNING et BROWNE [139] citent deux cas de femmes hystérectomisées chez qui on ne trouvait pas de prégnandiol dans l'urine même après injection de 24 mg. de progestérone ; ces femmes cependant éliminaient 41 à 58% du prégnandiol glucuronate injecté en solution aqueuse : (60 mg.) Il s'agissait donc d'un arrêt de la transformation en prégnandiol et non d'une impossibilité dans l'élimination de celui-ci.

HAMBLEN, ASHLEY, BAPTIST [52] ne trouvent pas non plus de prégnandiol chez une femme hystérectomisée ; ils signalent deux cas dans lesquels l'arrêt de l'élimination a été provoqué par un curetage effectué le 23e et le 25e jour du cycle.

Mais l'endomètre n'est probablement pas le seul lieu de dégradation de la progestérone, car BUXTON et WESTPHAL [25] démontrent que l'homme est capable de métaboliser la progestérone (prégnandiol retrouvé dans l'urine de trois hommes après injection de progestérone. (Déjà cité page 118).

D'autre part, BUXTON [24], reprenant la question des hystérectomies étudie 4 femmes recevant 30 mg. de progestérone par jour. 3 d'entre elles ont une hystérectomie « subtotale » et une 4e une hystérectomie totale. 2 éliminent de petites quantités de prégnandiol, 3,7 mg. un jour dans le cas de l'hystérectomie totale, 1,9 mg., 1,8 et 1,7 mg. dans le cas d'une « subtotale ». Les deux autres (subtotales), n'en éliminent pas du tout.

Enfin, U. WESTPHAL observe la transformation d'une partie de la progestérone injectée à un lapin mâle en prégnandiol glucuronate [146].

L'utérus ne serait donc pas le siège de cette réduction.

Ces résultats contradictoires sont d'ailleurs liés au problème discuté de l'utilisation de la progestérone injectée (voir page 142). Il serait imprudent d'en tirer plus que des indications.

LIEU DE LA GLUCUROCONJUGAISON

La glucuroconjugaison du prégnandiol n'a pas été à notre connaissance l'objet d'études particulières. Il est très probable qu'elle s'effectue dans le foie. Il semble en effet que cet organe soit le principal lieu de conjugaison de l'acide glucuronique, comme l'ont montré des perfusions faites avec diverses substances (phénol, camphre, chloral, bornéol) (HEMINGWAY, PRYDE, WILLIAMS [63]).

CONCLUSIONS

I) La constitution chimique du prégnandiol découvert dans l'urine en 1929 est connue depuis 1930. Ses relations chimiques avec les substances voisines ont fait l'objet de nombreux travaux. La position du prégnandiol parmi les autres stéroïdes sexuels a été ainsi bien établie, en particulier ses relations de filiation avec la progestérone qui apparaît comme sa substance mère essentielle.

Il s'élimine surtout sous forme d'un glucuroconjugué, le prégnandiol glucuronate de sodium. La structure de ce conjugué a été récemment mise au point par les voies de l'analyse et de la synthèse. On sait qu'il s'agit d'un acide prégnandiol 3 d glucuronique.

Nous apportons quelques contributions de détail aux propriétés physiques (aspect, solubilité) du prégnandiol et de son glucuronide. Les rares réactions colorées de ces substances sont peu spécifiques ; nous en indiquons deux qui le sont davantage tout en étant des réactions de groupe :

1°) La réaction au pentachlorure d'antimoine applicable au prégnandiol sous sa forme libre.

2°) Une application au prégnandiol glucuronide de la réaction phosphovanillique.

II) Les méthodes de dosage du prégnandiol urinaire sont déjà nombreuses. Nous publions une étude critique des méthodes connues en France en 1943 - 1944, (méthodes de VENNING (1937), BEALL (1937), WEIL (1938), CRISMER (1939), ASTWOOD et JONES (1941), JAYLE (1943). Nous décrivons les méthodes d'ALLEN et VIERGIVER (1941), TALBOT (1941 et 1943), GUTERMAN (1944) que nous n'avons pu essayer, ces méthodes américaines étant venues à notre connaissance trop tardivement.

III) Ces différentes méthodes, du moins celles que nous avons pu pratiquer, ne sont pas entièrement satisfaisantes. Les résultats sont souvent insuffisants en précision et en sensibilité avec les urines pauvres en prégnandiol.

Nous proposons une méthode dosant le prégnandiol total après hydrolyse du prégnandiol glucuroconjugué au moyen de la réaction colorée au pentachlorure d'antimoine que nous avons mise au point. Cette réaction est donnée par certains corps appartenant au groupe des stédols, possédant un même groupement moléculaire (voir page 94). Dans les conditions réalisées par notre technique d'extraction la spécificité de la réaction donne satisfaction. La coloration verte obtenue est comparée à celle fournie par une solution tirée de prégnandiol. La méthode est sensible à moins d'un milligramme.

IV) Tout en poursuivant l'étude des techniques de dosage, nous avons suivi avec la méthode de VENNING, l'élimination du prégnandiol dans un certain nombre de cas normaux ou pathologiques. Les résultats ainsi obtenus sont très comparables à ceux publiés par différents auteurs. Leur ensemble, réuni dans la 4e partie, permet de tirer quelques conclusions générales sur l'origine et le métabolisme du prégnandiol : il représente la forme d'élimination urinaire de la progestérone et, à un moindre degré, de la désoxycorticostérone.

La progestérone lui donnant naissance peut provenir du corps jaune de l'ovaire, du placenta, voire même du cortex surrénal. Le prégnandiol apparaît au cours de la phase lutéale du cycle menstruel en petite quantité (3 à 10 mg. par 24 heures). Il disparaît au moment des règles. S'il y a eu fécondation, l'élimination persiste, puis augmente pour atteindre des valeurs élevées au 8e mois (60 à 80 mg.) avec d'amples variations journalières.

Le taux s'effondre au moment de l'accouchement pour s'annuler deux ou trois jours après. Cette chute brutale est due à la disparition du placenta qui constitue le principal producteur de progestérone à partir du 3e mois. Nous publions un cas de persistance de l'élimination du prégnandiol au cours d'une grossesse évoluant normalement malgré l'ablation du corps jaune gravidique. Cette observation est une preuve de plus du rôle endocrinien du placenta

Les résultats obtenus avec notre technique personnelle (3e partie, chapitre III) ne s'opposent pas aux conceptions admises. La plus grande sensibilité permet de préciser quelque peu l'élimi-

nation au cours du cycle menstruel. Nous y joignons quelques observations chez des malades porteurs de tumeurs de la corticocurrénale.

Vu : *Le Président de la Thèse.*

P. FLEURY

Vu : *Le Doyen de la Faculté de Pharmacie*
Pour le Doyen.

M. SOMMELET

Vu et permis d'imprimer le 3 Octobre 1946

Le Recteur de l'Académie de Paris..

G. ROUSSY

DEUXIEME THESE

PROPOSITION DONNEE PAR LA FACULTE

L'Héparine

Etude chimique et physiologique.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

NOTA. — 1) Les numéros de la colonne de gauche sont placés entre crochets dans le texte à côté des mémoires cités.
2) Les chiffres de la colonne de droite renvoient aux pages du texte où se trouve mentionné le travail référé.
3) Les pages du mémoire indiquées correspondent au commencement et à la fin de l'article.

1 ADLER (A.A.) Active and inactive form of the hormone promoting Comb Growth. *Nature* 1934, **133**, 798 18

2 ALLEN (W.N..) in Allen (E) : Sex and internal secretions.
Baltimore 2e ed. 1939 ..... 8, 115

3 ALLEN (W.N.) et VIERGIVER (E) A titrimetric method for the determination of sodium pregnandiolglucuronidate in the urine of pregnant women.
J. of Biol. Chem. 1941 **141**, 837 - 852 .. 20 47, 59, 125

4 ALLEN (W.N.), VIERGIVER (E) et SOULE (S.D.) J. Clin Endocrinology 1944, 4, 202 - 207 in SALTER W.T. the chemistry of the Hormones. Ann. Rev. of Biochem. 1945, 14, 561 - 598 144

5 ASTWOOD (E.B.) et JONES (G.E.S.) A simple method of quantitative détermination of pregnandiol in human urine.
J. of Biol. Chem. 1941, **137**, 397 - 407 .. 19, 69, 74 100, 102, 125

6 BACHMAN (C.) LEEKLEY (D.) et HIRSHMANN (H.)Excretion of sodium pregnandiolglucuronidate in normal pregnancy urine.
J. of clin. Invest. 1940, **19**, 801 .....

7 BANCIU (D) Contribution à l'étude fonctionnelle du corps jaune par le dosage du prégnandiol.
Thèse Med. Paris 1939 48 p ; *Arnette ed.* .. 45

8 BEALL (D) A method for the isolation of pregnandiol from human pregnancy urine.
Biochem. J. 1937, **31**, 35 - 40 ..... 8, 12, 15, 21 22, 63, 64

9 BEALL (D) The isolation of progesterone and 3-20 alloprégnanol one from ox adrenals.
Biochem. J. 1938, **32**, 1957 16

10 BEALL (D) et REICHSTEIN (J.T.) Isolation of progesterone and allopregnandiolone from the adrenal.
Nature 1938, **142**, 479 141

11 BECLERE (C) et SIMONNET (H.) l'amenorrhée hyperhomonale des jeunes filles - son traitement par l'hormone du corps jaune.
Presse médicale 1943, **51**, 631 - 632 122

12 BROWNE (J.S.L.), HENRY (J.S.) et VENNING (E.H.) Urinary excretion of sodium pregnandiolglucuronidate in normal pregnancy.
J. of clin. Invest. 1937, **16**, 678 124

13 BROWNE (J.S.L.) HENRY (J.B.) VENNING (E. H.) The urinary excretion of prolan and pregnandiol in normal pregnancy and in early and late toxemias.
J. of clin. Invest. 1938, **17**, 503 125

14 BROWNE (J.S.L.) HENRY (J.S.) et VENNING (E.H.. The significance of endocrine assays in threatened and habitual abortion.
Am. J. of obst and gynec. 1939, **38**, 927-953 139

15 BUCHER (N.L.R.) et GESCHICKTER (C..F.) Recovery of pregnandiol from urine.
Endocrinology 1940, **27**, 726 - 733 36

16 BUTENANDT (A.) Über das Pregnandiol, einen Sterin Abkömmling aus Schwangerenharn.
Ber deutsch. chem. Ges. 1930 **63**, 659 - 663.7, 8, 11, 115

17 BUTENANDT (A.) Über die Reindarstellung des Follikelhormons aus Schwangerenharn.
Z. f. physiol. Chem. **1930, 191**, 127 - 139. 11

18 BUTENANDT (A.) et FLEISCHER (G.) Notiz über die Katalytische Hydrierung des Progesterons.
Ber. deutsch. chem. Gest. 1935 68 2094 - 2097 137

19 BUTENANDT (A.), HILDEBRANDT (F.), BRÜCHER (H.) Über das Pregnandiol einen neuen Sterin Abkömmling aus Schwangerenharn.
Ber. deutsch. chem. Ges. 1931, **64**, 2529 - 2539 12

20 BUTENANDT (A.) et MAMOLI (L.) Über allopregnanol 3 on 20 einen Begleitstoff des corpus-luteum-hormone.
Ber. Deutsch. chem. Ges. 1934 **67**, 1897 - 1901 14

21 BUTENANDT (A.) et SCHMIDT (J.) Über Pregnanol 20 on 3.
Ber. Deutsch. chem. Ges. 1934 **67**, 1893 - 1896 19

22 BUTENANDT (A.) et SCHMIDT (J.) Überfürung des pregnandiols in corpus luteum hormone.
Ber. Deutsch. chem. Ges. 1934, **67**, 1901 - 1904 13

23 BUTLER (G..C.) et MARRRIAN (G.F.) The isolation of pregnane 3 - 17 - 20 triol from the urine of women showing the adrenogenital syndrome.
J. of Biol. Chem. 1937, **119**, 565 - 571 .. 15, 141

24 BUXTON (C.L.) Prégnandiol détermination as an aid in clinical diagnosis.
Am. J. or obst and gynec. 1940, **40**, 202 - 211 125 .133, 145

25 BUXTON (C.L.) et WESTPHAL (U.) Recovery of pregnandiol in urine of men treated with progesterone.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1939, **41**, 284 - 287 119. 143, 145

26 CHABROL (E.) CHARONNAT (R.) COTTET (J.) et BLONDE (P.) Une nouvelle technique de dosage des sels biliaires. (réaction phosphovanillique)
C.R. Soc. de Biol. 1934, **115**, 834 23

27 CHEYMOL (J.) et HENRY (R.) Appareil à épuisement continu des solutions aqueuses par des liquides plus légers.
Rev. Scient. 1944, **82**, 241 - 243 ..... 97, 10[illegible]

28 COHEN (S.L.) et MARRIAN (G.F.) The isolation and identification of a combined form of oestriol in human pregnancy urine.
Biochem. J. 1936, **30**, 57 - 65 18

29 COPE (C.L.) Excretion of pregnandiol in toxemias of pregnancy.
Lancet, 1940, **2**, 158 125

30 COPE (C.L.) The excretion of pregnandiol and the corpus luteum.
Clin. Science 1940, 4, 217 - 241 ..... 33, 40, 43, 44 65, 66, 144

31 COPE (C.L.) Diagnostic value of pregnandiol excretion in pregnancy desorders.
Brit. Med. J. 1940, 2, 545 - 549 125

32 COTTET (J.) Une nouvelle technique de dosage des sels biliaires dans le sang. Ses résultats cliniques.
Thèse Medecine Paris 1935 132 p. *Le François édit.* 24, 25

33 CRISMER (R.) Principe d'une méthode de dosage de l'acide prégnandiolglycuronique dans l'urine.
C. R. Soc. Biol. 1939, 132, 50 - 52 ..... 47, 48

34 CUYLER (W.K.) ASHLEY (C.) et HAMBLEN (E. C.) Urinary excretion of pregnandiol complex by males following intramuscular administration of desoxycorticosterone acetate.
Endocrinology 1940, 27, 177 141

35 CUYLER (W.K.), HIRST (D.V.) et POWERS (J.. M.) et HAMBLEN (E.C.) Effects of desoxycorticosterone acétate on 17 Ketostéroide and pregnandiol excretions.
Journ. Clin. Endocrinology 1942, 2, 373 - 376. 141

36 DAVIS (C.D.) HAMBLEN (E.C..) CUYLER (W.K.) et BAPTIST (M.) Progesterone therapy and progestin metabolism in abortion.
J. Clin. Endocrinology 1942, 2, 377 - 382. 144

37 DINGEMANSE (E.), DE JONGH (S.E.) KOBER (S.) et LAQUEUR (E.) Über kristallimsches Menformon.
Deutsch. Med. Wschr. 1930, 56, 301 - 306. 7, 85

38 ELDER (J.H.) Proc. Soc. exp. Biol and Med .1941 46, 57 in FISH DORFMAN et YOUNG [40] 134

39 FINKLER (R.S.) Pseudohermaphrodism. Pregnandiolglucuronidate excretion.
J. Clin. Endocrinology 1941, 1, 151 - 153. 141

40 FISH (W.R.) DORFMAN (R.L.) et YOUNG (W.C.) The isolation of pregnandiol 3 α 20 α from the urine of pregnant chimpanzees.
J. of Biol. Chem. 1942, 143, 715 - 720. .. 134 135

41 FISH (W.R.) HORWITT (B. N.) DORFMAN (R.I.) The conversion of desoxycorticostérone to pregnandiol 3 α 20 α.
Science 1943, **97**, 227 - 228 141

42 FISHMAN Studies on β glucuronidase.
J. of Biol. Chem. 1939, **127**, 367 - 373 .. 20, 79

43 FLORKIN (M.) et CRISMER (R.) Dosage photométrique des glucuroconjugués. Application à l'urine.
C. R. Soc. Biol. 1939, **131**, 1277 - 1280 .. 23, 47, 48

44 FLORKIN (M.) CRISMER (R.), DUCHATEAU (G.) et HOUET (R.). Sur les glucuronides et la β glucuronidase.
Enzymologia 1942, **10**, 220 - 233 .....

45 FRANK (R.T.) SOBOTKA (H.) Biological assay of pregnandiol.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1932, 29, 1026. 115

46 GENITIS (V.E.) et BRONSTEIN (L.P.) Pregnandiol excretion in female pseudohermaphroditism.
J. of Am. Med. Ass. 1942, **119**, 704 - 706. 141

47 GOLDHAMMER (H.) Über einige Versucke zur Isolierung des weiblichen Sexualhormons and über Fällbarkeit mit Antimonpentachlorid.
Biochem. Ztschr. 1929, **215**, 1 - 5 85

47 (bis) GUILLEBAUD (P.) A propos de l'élimination urinaire du prégnandiol. Thèse Med. Paris 1945. 120

48 GUTERMAN (H.S.) A human pregnancy test based upon a color réaction of pregnandiol in the urine.
J. clin. Endocrinology 1944, 4, 262 - 267. 74, 76

49 HAIN (A.M.) et ROBERTSON (E.M.) Estimation of lutcal activity and early diagnosis of pregnancy.
Lancet 1939, **1**, 1324 - 1325 133

50 HAIN (A.M.) et ROBERTSON (E.M.) Pregnanediol excretion in menstrual cycle.
Brit. Med. J. 1939, **1**, 1226 - 1228 133

51 HAMBLEN (E.C.) A syndrome characterized by an increased excretion of sodium pregnandiolglucuronide.
Endocrinology 1939, 24, 269 - 273 ..... 122, 143

52 HAMBLEN (E.C.M.) ASHLEY (C.) et BAPTIST (M.) Sodium pregnandiol glucuronide, the significance of its excretion in the urine. 38, 39, 121
Endocrinology 1939, 24, 1 ..... 143, 145

53 HAMBLEN (E.C.), CUYLER (W.K.) et HIRST (D.V.) Studies of progestin following intramuscular injections of progesterone.
Endocrinology 1940 27 33 - 36 144

54 HAMBLEN (E.C.), CUYLER (W.K.) et HIRST (D.V.) Urinary secretion of pregnandiol complex by males, I following its oral excretion, II following intramuscular administration of progesterone.
Endocrinology 1940 27 169 - 178 144

55 HAMBLEN (E.C.), CUYLER (W.K.), POWELL (N.P.) ASHLEY (C.) et BAPTIST (M.) Some clinical observations upon the metabolism and utilisation of cristalline progesterone. ..
Endocrinology 1939 25 13 - 16. 143

56 HAMBLEN (E.C.), POWELL (N.P.), CUYLER (W.K.) the metabolism and utilisation of progesterone.
Am. J. of obst. and gynec. 1939 38 557 .. 143

57 HARTMAN (M.) et LOCHER (F.) Über allopregnandiol einen neuen alkohol aus dem Schwangernharn.
Helv. Ch. Act. 1935 18 160 - 164 ..... 12, 15

58 HASLEWOOD (G. AD.) MARRIAN (G.F.) et SMITH (E.R.) Anew saturated solid alcohol from the urine of pregnant mares.
Biochem. J. 1934 28 1316. 15

59 HEARD (R.D.H.),BAULD (W.S.) et HOFFMAN (M.M.) Steroids : Estradiol and progesterone metabolism.
J. of Biol. Chem. 1941 141 709 - 710 .. 135

60 HEARD (R.D.H.), HOFFMAN (M.M.) et MACK (G.E.) Steroids : the structure of pregnanediol glucuronide from human pregnancy urine.
J. of Biol. Chem. 1944 155 607 - 614 .. 18

61 HEARD (R.D.H.) et MAC KAY (A.F.) the isolation of a new androstanol 3 β one and of allognegnanol 3 β one 20 from the urine of pregnant mares.
J. of Biol. Chem. 1939 131 371 125

62 HECHTER (O.) Compârison between gravimetrie and reduction methods for determination of pregnandiolglucuronidate.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 1942 49 299 - 302. 47

63 HEMINGWAY (A.), PRYDE (J.) et WILLIAMS (R.T.) The site and mechanism of the formation of conjugated glucuronic acid.
Biochem. J. 1934 28 136 - 142 146

64 HIRSCHMANN (H.) Steroids of urine of ovariectomized women.
J. of Biol. Chem. 1940 136 483 - 501 141

65 HIRSCHMANN (H.) Preparation of a Pregnanetriol 3 α , 17, 20,
J. of Biol. Chem. 1941 140 797 - 806 .. 15

65 bis HOFFMAN (M.M.) Can. Med. Ass. J. 1942 47 424 - 431 in SALTER (W.T.) The chemisty of the Rormone. Ann. Rev. of Biochem. 1945 14 561 - 598 144

66 HOFFMAN (M.M.) KAZMIN (V.E.) et BROWNE (J.S.L.) The excretion of pregnandiol following the administration of desoxycotricosterone acetate to rabbits.
J. of Biol. Chem. 1943 147 259 - 260. 134, 141

67 HOFFMAN (F.) et von LAM (L.) Über den Progesteronachweis in corporalutea, Placenta und in Schangerenblut mit Hilfe einer intrauterin Testeereungsmethode.
Z. bl. gynäk 1941 65 2014 - 2017 117

68 HOFFMAN (F.) et von LAM (L.)
Chem. Zentr. 1943 2 1021 in SALTER (W.T.) The chemisty of the Hormones.
Ann. Rev. of Biochem. 1945 14 561 - 598 144

69 HORWITT (B.N.), DORFMAN (R.I.), SHIPLEY (R.A.) et FISH (W.R.)
J. of Biol. Chem. 1944 155 213 - 218 in SALTER. The chemisty of the hormones.
Ann. Rev. of Biochem 1945 14 561 - 598 142

70 HUEBNER (C.F.), OVERMAN (R.S.) et LINK (K.P.) The synthesis of pregnandiol 3 β d glucuronide.
J. of Biol. Chem. 1944 155 615 - 617 .. 18, 22

71 JAYLE (M.F.) Elimination urinaire des hormones ovariennes . in *Exposés annuels de Biochimie Médicale* - Quatrième série, pages 191 - 218, Paris 1944, Masson édit. 12, 15

72 JAYLE (M.), CREPY (O.) et WOLF (P.). Evaluation colorimétrique du prégnandiol urinaire.
Bull. Soc. Chim. biol. 1943, 25, 308 - 317. 47, 50

73 JAYLE (M.) et LIBERT (O.) dosage colorimétrique du prégnandiol au cours du cycle menstruel et de la grossesse. 54
Bull. Soc. Chim. biol. 1946, 28, 372 - 381. 108, 122, 125 130, 133, 134

74 JONES (C.E.S.), DELFS (E.) et STRAN (H.M.) Chorionic gonadotrophin and pregnandiol values in normal pregnancy.
Bull. Johns Hopkins. Hosp. 1944, 75, 359 - 376. ..... 71, 125

75 JONES (H.W.) et WEILL (P.G.) The corpus luteim hormone in early pregnancy.
J. of. Amer Med. Assoc. 1938, 111, 519. 139

76 KATZMAN (P.A.) et DOISY (E.A.) Preparation of extracts of the anterior pituitary - like substances of urine of pregnancy.
J. of Biol. Chem. 1932, 98, 739 - 754 .... 63, 79

77 KOCH (F.C.) Hormones : progesterone.
Ann. Rev. of Biochem. 1940, 9, 327 14

78 KNOPPERS (A.T.) Pregnandiol estimations in the urine of laboratory animals.
Proc. Ned. Akad. v. Wetensch. Amsterdam. 1940, 43, 1127 - 1132 ..... 45 63, 66, 134

79 LOEWE et VOSS Nachweis des Vorkommens von Gelbkorperhormon in Frauenharn.
Schweiz. Med. Woch. 1934, 64, 1049 - 1050. 14

80 LIEBERMAN (S.) et DOBRINER (K.) The isolation of pregnandiol 3 17 one, 20 from human urine.
J. of Biol. Chem. 1945, 161, 269 - 278 .. 15

81 MARKER (R.E.) The origin and interrelationships of the steroidal Hormones.
J. of. Amer. Chem. Soc. 1938, 60, 1725 - 1736. 137

82 MARKER (R.R.) The steroid content of cow's pregnancy urine.
J. of Amer. chem. Soc. 1938, **60**, 2442 - 2444. 135

83 MARKER (R.E.) The steroidal content of Steer's urine.
J. of Amer. Chem. Soc. 1939, **61**, 1287 - 1290. 135

84 MARKER (R.E.), BINKLEY (S.B.), WITTLE (E.L.) et LAWSON (E.J.). The 3 hydroxysteroids in human pregnancy urine.
J. of Amer. Chem. Soc. 1938, **60**, 1904 - 1905. 16, 111

85 MARKER (R.E.) et HARTMAN (C.G.) Assays of urine from rhesus monkeys for pregnandiol and other steroids.
J. of Biol. Chem. 1940, **133**, 527 - 537. 135

86 MARKER (R.E.) et KAMM (O.). Isolation of pregnanolone from human pregnancy urine.
J. of Amer. Chem. Soc. 1937, **59**, 1373 - 1374 14, 15

87 MARKER (R.E.), KAMM (O.), CROOKES (H.M.), OAKWOOD (L.S.), LAWSON (E.J.) et WITTLE (E.L.). Pregnandiols in pregnancy urines of mares.
J. of Amer. Chem. Soc. 1937, **59**, 2297 .. 15, 135

88 MARKER (R.E.), KAMM (O.), CROOKES (H.M.), DAKWOOD (T.S.), WITTLE (E.L.) et LAWSON (E.L.). Pregnandiols from pregnancy urine.
J. of Amer. Chem. Soc. 1938, **60**, 210 - 211. 135

89 MARKER (R.E.), KAMM (O.), MAC GINTY (D.A.) JONES (D.M.), WITTLE (E.L.), OAKWOOD (T.S.) et CROOKES (H.M.). The synthetic preparation of epiallopregnanolone, the androgenic principle of human pregnancy urine.
J. of Amer. Chem. Soc. 1937, **59**, 1367 - 1368. 14, 16

90 MARKER (R.E.), KAMM (O.) et MAC GREW (R.V.). Isolation of epi allopregnanol 3 one 20 from human pregnancy urine.
J. of Amer. Chem. Soc. 1937, **59**, 616 .. 16

91 MARKER (R.E.), KAMM (O.) et WITTLE (E.L.). The pregnandiolones.
J. of Amer. Chem. Soc. 1937, **59**, 1841 .. 14

92 MARKER (R.E.), KAMM (O.), WITTLE (E.L.), OAKWOOD (T.S.) et LAWSON (E.J.). The structure of pregnanetriols.
J. of Amer. Chem. Soc. 1938, **60**, 1067 - 1071. 15

93 MARKER (R.E.), KAMM (O.), WITTLE (E.L.), OAKWOOD (T.S.), LAWSON (E.J.) et LAUCIUS (J.F.). The pregnandiol and pregnanolones.
J. of. Amer. Chem. Soc. 1937 59 2291 - 2296. 14

94 MARKER (R.E.) et LAWSON (E.J.) Δ 4 pregnenone 3.
J. of Amer. Chem. Soc. 1939, 586 - 587 .. 14

95 MARKER (R.E.) et LAWSON (E.J.). Reduction products of progesterone and the pregnanediones.
J. of Amer. Chem. Soc. 1939, **61**, 588 - 590. 14

96 MARKER (R.E.), LAWSON (E.J.), RORHMANN (E.) et WITTLE (E.L.). Carbinols from stalliens urines.
J. of Amer. Chem. Soc. 1938, **60**, 1555 - 1558 135

97 MARKER (R.E.), LAWSON (E.J.), WITTLE (E.L.) et CROOKES (A.M.). Ketones from Mare's Pregnancy urine.
J. of Amer. Chem. Soc. 1938, **60** 1559 - 1561. 15, 16, 135

98 MARKER (R.E.), OAKWOOD (T.S.), WITTLE (E.L.) LAWSON (E.J.). Urane derivatives.
J. of Amer. Chem. Soc. 1938, **60**, 1061 - 1066. 16, 135

99 MARKER (R.E.) et RORHMANN (E.). Pregnenediol in mar's pregnancy urine and its conversion into progesterone.
J. of Amer. Chem- Soc. 1938, **60**, 1565 .. 15, 16

100 MARKER (R.E.) et RORHMANN (E.). Sterols from sow pregnancy urine.
J. of Amer. Chem. Soc. 1939, **61**, 3476 - 3477. 15, 135

101 MARKER (R.E.), RORHMANN (E.) et WITTLE (E.L.), Uranediol from Mare's pregnancy urine.
J. of Amer. Chem. Soc. 1938, **60**, 1561 - 1564. 16, 135

102 MARKER (R.E.) et WITTLE (E.L.). Etiocholanics acids from the pregnandiol.
J. of Amer. Chem. Soc. 1939, **61**, 1329 .. 14

103 MARKER (R.E.), WITTLE (E.L.) et LAWSON (E.J.). Isolation of Pregnanediols from Bull's urine.
J. of Amer. Chem. Soc. 1938, **60**, 2931 - 2933. 16, 135

104 MARRIAN (G.F.). The chemisty of oestrin. Preparation from urine and separation from an unindentified solid alcohol.
Biochem. J. 1929, **23**, 1090 ..... 7, 9, 16, 115

105 MASON (H.L.) et KEPLER (E.J.). Isolation of steroids from the urine of patients with adrenal cortical hyperplasia.
J. of Biol. Chem. 1945, **161**, 235 - 257 .. 15, 16

106 MAUGHAN (G.B.), EVELYN (K.A.) et BROWNE (J.S.L.)). A method for the quantitative estimation of glucuronic acid and conjugated glucuronides.
J. of Biol. Chem. 1938, **126**, 567 - 572 .. 55

107 MOLONEY (P.J.) et FINDLAY (D.M.). Concentration of insulin by absorption on benzoic acid.
J. of Biol. Chem. 1923, **57**, 359 - 361 63

108 NETTER (A.). Etude critique des tests de la fonction ovarienne.
Presse Med. 1942, **50**, 124 - 126 83

109 ODELL (A.D.) et MARRIAN (G.F.). A note of the presence in human pregnancy urine of an acid hydrolisable combined from of pregnandiol.
Biochem. J. 1946, **30**, 1533 - 1535 ..... 8, 18, 21

110 ODELL (A.D.) et MARRIAN (G.F.). Some observations of the constitution of the pregnandiol occuring in the urine of pregnant mares.
J. of Biol. Chem. 1938, **125**, 333 - 340 .. 15, 135

111 PATTEE (C.J.), VENNING (E.H.) et BROWNE (J.S.L.). The effect of oestrogens on the pregrandiol output during the menstrual cycle.
Endocrinology 1940, **27**, 720 - 726 143

112 PEARLMAN (W.H.), PINCUS (G.) et WERTHESSEN (N.T.). The isolation of allopregnanol 3 β one 20 from human pregnancy urine.
J. of Biol. Chem. 1942, **142**, 649 - 652 .. 16

113 PETERSON (D.H.), HOSKINS (W.H.), COFFMAN (J.R.) et KOCH (F.C.). The nature of the physiologically inactive form of androgens in human urine.
J. of Biol. Chem. 1938, 123, XCIII 62

114 PORTES (L.), SIMONNET (H.) et ROBEY (M.) I. - Absence d'élimination urinaire de prégnandiol au cours d'un cycle artificiel ; II. - Substitution de la desoxycorticosterone à la progesterone au cours d'un cycle artificiel ; règles ; absence de réaction progestationnelle.
Ann. d'Endocrinologie 1943, 4, 122 - 123. 142

115 RAOUL et MEUNIER. - Nouvelle application de la colorimétrie cinétique à l'étude et au dosage des vitamines et provitamines D.
C. R. Ac. des Sciences 1939, 209, 546 - 548. 94

116 REICHSTEIN (T.) et VON EUW (J.). Über bestandteile des Nebennierenrinde isolierung des desoxycorticosterone.
Helv. Chem. acta. 1938, 21, 1197 141

117 ROBEY (M.). Contribution à l'étude du prégnandiol - Thèse Méd. Paris, 1941, Jouve Edit. 70 p. 21, 45, 66, 116, 124, 129

118 SALMON (V.J.), GEIST (S.M.) et SALMON (A.A.) Excretion of pregnandiol in women with virilism.
Proc. soc. exp. Biol. and Med. 1941, 47, 279 - 280 141

119 SCHAFFER (P.A.), HARTMAN (A.F.) et SOMOGYI (M.) in PETERS (J.P.) et VANSLYKE (D.D.). Quantitative clinical chemisty. Methods (p. 465 - 471) Baltimore 1932, 957 p. 61

120 SEEGAR (G.E.), DELFS (E.), Pregnandiol excretion following bilateral oophorectomy in early pregnancy.
J. Am. Med. Ass. 1943, 15, 1267 - 1268 ... 139

121 SEGUY (E.) code universel des couleurs.
Paris, 1936, Lechevallier édit. 87

122 SIMONNET (H.) et ROBEY (M.). Le corps jaune - Etude biologique clinique et thérapeutique.
Paris, 1939, Masson édit. 170 p. 118

123 SIMONNET (H.), BECLERE (C.). Valeur biologique et signification des dosages d'hormone gonadotrope, de folliculine et de pregnandiol dans les urines.
Presse Médicale, 1943, 51, 91 - 92 38

124 SMITH (I.T.) et WERTHESSEN (N.T.). Chorioepithelioma associated with tubal pregnancy and pulmonary metastases - High gonadotrophin and low pregnandiol values.
Am. J. obst. gynec. 1941, 41, 153 - 156 .. 125

125 STEINLE (E.V.) et KALHENBERG (L.). A new method for the identification and estimation of cholesterol and certain others compounds.
J. of Biol. Chem. 1926, 67, 425 - 467 85

126 STOVER (R.F.) et Pratt (J.P.). Progestin studies : Pregnandiol excretion.
Endocrinology 1939, 24, 29 - 37 143

127 STRICKLER (H.C.), WALTON (E.M.) et WILSON Failure to find sodium pregnandiol glucuronidate in Bull's urine.
Proc. Sod. exp. Biol. and Med. 1941, 48, 37 - 38 135

128 TALBOT (N.B.), BERMAN (R.A.), MAC LACHLAN (E.A.) et WOLFE (J.K.). The colorimetric determination of neutral steroids (hormones) in a 24 hours sample of human urine (pregnandiol, total alpha and beta alcoholic and non alcoholic 17 ketosteroids).
J. clin. Endocrinology 1941, 1, 668 - 673 .. 17, 74

129 TALBOT (N.B.) RYAN (J.) et WOLFE (J.K.) The determination of sodium dehydroisoandrosterone sulfate in water or urine.
J. of. Biol. Chem. 1943, 148, 593 - 602 .. 79

130 TALBOT (N.B.), RYAN (J.) et WOLFE (J.K.). Enzymatic hydrolysis of urinary sodium pregnandiol glucuronidate to free preganadiol.
J. of Biol. Chem. 1943, 151, 607 ..... 20, 79

131 TOLLENS (C.). Der nachweis von Glukuronsaüre oder Glykuron saüre nach B. TOLLENS in menschlichen urine.
Z. f. physiol. Chem. 1908, 56, 115 - 116 .. 23, 47

132 TOLLENS (C.). Quantitative Bestimung des Glukuronsaüre im urine mit der Furfurol - Salzsaüre distillations methode.
Z. f. physiol. Chem. 1909, **61**, 95 - 11 .. 23, 47

133 VEITSH (F.P.), MILONE (H.S.) et EVERIT (E.L.). The hydrolysis of sterolglycosides by emulsin.
Science 1938, **88**, 551 ..... 20, 78

134 VENNING (E.H.). Gravimetric methode for the determination of sodium pregnandiolglucuronidate.
J. of Biol. Chem. 1937, **119**, 473 - 480 .. 21, 32, 37

135 VENNING (E.H.). Further studies of the estimation of small accounts of sodium pregnandiol glucuronidate in urine.
J. of Biol. Chem. 1938, **126**, 595 - 602 .. 33, 37

136 VENNING (E.H.) et BROWNE (J.S.L.). Isolation of a water soluble pregnandiol complex from human pregnancy urine.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1936, **34**, 792- 793. 18, 32

137 VENNING (E.H.) et BROWNE (J.S.L.). Urinary excretion of sodium pregnandiol glucuronidate in the menstrual cycle.
Amer. J. of Physiol. 1937, **119**, 417 120

138 VENNING (E.H.) et BROWNE (J.S.L.). Studies on corpus luteum function. The urinary excretion of sodium pregnandiol glucuronidate in the human menstrual cycle.
Endocrinology 1937, **21**, 711 - 721 ..... 120, 142

139 VENNING (E.H.) et BROWNE (J.S.L.). A study of the metabolism of progesterone.
Am. J. of Physiol. 1938, **123**, 209 ..... 142, 145

140 VENNING (E.H.) et BROWNE (J.S.L.). A study of the metabolism of cristalline progesterone.
Endocrinology 1940, **27**, 707 - 720 144

141 VENNING (E.H.) HENRY (J.S.) et BROWNE (J.S.L.). The measurement of a pregnandiol complex in human urine.
Can. Med. Ass. J. 1937, **36**, 83 ..... 36, 37, 121

142 VENNING (E.H.), WEIL (P.G.) et BROWNE (J.S.L.), Excution of sodium pregnandiol glucuronidate in the adrenogenital syndrome.
J. of Biol. Chem. 1939, **128**, CVII 141

143 VIGNES (H.) et ROBEY (M.). Périodes de fécondité et de stérilité chez la femme, 1 vol. *Paris* 1938 - Masson Edit. 89 p. 108

144 WEIL (P.G.). A method for the isolation of pregnandiol from the urine of pregnant mares. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1938, 38, 503 - 504. 19, 77

145 WEIL (P.G.). The excretion of pregnandiol in the toxemies of pregnancy. *Science* 1938, 87, 73 125

146 WESTPHAL (U.) Über die umwandlung des progesterons in Pregnaidiol bein Kanichen. *Z. f. physiol. Chem.* 1942, 273, 1 - 12 145

147 WESTPHAL (U.) Über die reductive umwandlung des Desoxycorticosterons zu pregnandiol in organismus des Kaninchens. *Z. f. physiol. Chem.* 1942, 273, 13 - 23 142

147 bis WESTPHAL (U) über den Nachweis von Pregnandiolglukuronide im Harn normaler Fraüen und Männen. *Z. f. physiol. Chem.* 1944, 281 14 - 24. 20, 113

148 WESTPHAL (U.) et BUXTON (C.L.). Failure to recover glucuronidate of pregnandiol in monkeis, rabbits and cats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1939, 42, 749 - 750. 134

149 WILSON (R.B.) et RANDALL (L.M.). Studies on pregnandiol (I). *Proc. Stoff. Meet. Mayo. clin.* 1938, 13, 813. 124, 129, 139

150 WILSON (R.B.), RANDALL (L.M.) et OSTERBERG (A.E.). Studies on pregnandiol (I). *Proc. Staff. Meet. Mayo. clin.* 1939, 13, 197 - 202 ..... 38, 121

151 WILSON (R.B.), RANDALL (L.M.) et OSTERBERG (A.E.). Studies on Pregnandiol. *Am. J. of obst and Gynec.* 1939, 37, 59 - 69. 121, 133

152 WINTERSTEINER (O.). The adrenogenital syndrome. *J. Am. Med. Assoc.* 1941, 116, 2679 - 2683 .. 141